

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Ekologie a ochrana prostředí

Ochrana životního prostředí



**Anna Kolpakova**

Kvalitativní analýza pylu ve velikostně rozlišeném aerosolu

Pollen Characterization in size segregated aerosol

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jan Hovorka, Ph.D.

Praha, 2017

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu.

V Praze dne

.....

Anna Kolpakova

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Hovorkovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Děkuji za konzultace a poskytnutí materiálů a vybavení pro experimentální úkoly. Chtěla bych velice poděkovat Mgr. Miroslavu Klánovi za pomoc při SEM analýze.

**Abstrakt:**

Tato bakalářská práce v rešeršní části uvádí do problematiky bioaerosolu, popisuje význam pylu, způsoby jeho šíření a vliv na zdraví člověka, shrnuje metody odběru pylu z ovzduší a běžné způsoby identifikace pylových zrn. V experimentální části práce prokazuje vhodnost využití prvního stupně vysokoobjemového kaskádního impaktoru (Hi-Vol) BGI-900 k odběru bioaerosolu a následné SEM analýze pylu. Byla vypracována metoda separace pylových zrn z polyuretanové pěny (PUF), která je impakčním substrátem HiVol impaktoru, na homogenní depozit na nylonový filtr. Reprezentativní část depozitu byla analyzována skenovací elektronovou mikroskopií - SEM. Pro celkem 12 vzorků ze třech lokalit v ČR, bylo vytvořeno celkem 485 snímků SEM. Na 295 snímcích byla identifikována pylová zrna do 9 rodů a 4 čeledí a kvantifikována četnost deformit, která činila 24, 18, 50% na lokalitách Praha, Březno a Láz. Pouze v Praze počet pylových zrn rostl s celkovou hmotností aerosolu. Ve vzorcích byly identifikovány sekreční produkty hmyzu brochosomy.

**Klíčová slova:** pyl, pylová zrna, bioaerosol, kaskádní impaktor, SEM.

**Abstract:**

This bachelor thesis, in literature review, deals with bioaerosol issue, describes meaning of pollen, ways of pollen spreading and its influence on human health, summarize methods of pollen sampling from the air and common ways of pollen grains identification. In the experimental part, the use of the first stage of a High Volumetric Cascade Impactor (Hi-Vol) BGI-900 for bioaerosol sampling and subsequent SEM analysis was proved. Method of pollen separation from the impaction substrate, polyurethane foam, into homogeneous deposit on Nylon filter was optimized. Representative portion of the deposit was analyzed by SEM. There were taken 485 SEM pictures from 12 samples in 3 localities in the ČR. Pollen grains were identified in 295 SEM and determined into 9 genus and 4 families and grain deformities were quantified to be 24, 18, 50% for Prague, Brezno and Láz localities. Number of pollen increased with total aerosol mass in Prague locality only. There also identified insect secretion products brochosomes in the samples.

**Key words:** pollen, pollen grain, bioaerosol, cascade impactor, SEM.

1. Úvod .....	6
2. Rešeršní část .....	7
2.1. Bioaerosol .....	7
2.1.1. Biologické zbraně.....	8
2.1.2. Kondenzační/krystalizační jádra .....	8
2.2. Význam pylu.....	9
2.2.1. Reprodukční funkce pylu .....	9
2.2.2. Pylová alergie .....	10
2.2.3. Pylové sezóny.....	10
2.2.4 Pylová informační služba .....	11
2.2.5 Pyly jako krystalizační jádra .....	11
2.3. Koncentrace pylu v atmosféře .....	12
2.4. Transport pylu v ovzduší .....	13
2.4.1. Šíření větrem .....	13
2.4.2. Šíření vodou .....	14
2.4.3. Šíření hmyzem.....	14
2.5. Faktory ovlivňující výskyt pylu .....	15
2.7. Charakteristika pylového zrna .....	15
3. Metody používané pro odběr vzorků bioaerosolu .....	17
3.1. Sedimentační metody .....	18
3.2. Filtry .....	19
3.3. Impingery .....	19
3.4. Impaktory .....	20
4. Metody používané pro identifikaci pylu.....	21
4.1. Optická mikroskopie.....	21
4.2. Elektronová mikroskopie .....	21
4.3. Amplifikace DNA (PCR) .....	21
4.4. Laserem indukovaná fluorimetrie (LIF).....	22
5. Metodika .....	22
5.1. Vysokoobjemový kaskádní impaktor (Hi-Vol).....	22
5.2. Separace aerosolu .....	25
5.3 Filtrace .....	26
5.3. SEM analýza .....	27

5.4. Lokality .....	28
6. Výsledky a diskuze .....	30
6.1. Morfologická analýza .....	30
6.2. Nalezené deformity .....	41
6.3. Homogenita vzorků .....	41
6.4. Variabilita .....	42
6.5. Korelace počtu částic bioaerosolu s hmotností aerosolu .....	42
7. Závěr .....	43
8. Seznam použité literatury .....	44

## 1. Úvod

Aerosol je koloidní systém pevných nebo kapalných částic v plynném médiu. Zvláštní skupinou aerosolů je bioaerosol, který je obecně rozlišován na živý (např. pylová zrna, bakterie, houby, viry atd.) a mrtvý jako jsou fragmenty těl organismů např. živočišné lupy a zbytky rostlin. Do skupiny bioaerosolů také patří vedlejší produkty biologické aktivity organismů. Tato skupina aerosolů zahrnuje obrovskou škálu organické hmoty s významnou variabilitou fyzikálních a chemických vlastností jako je velikost, tvar, fáze, složení, struktura, rozpustnost, těkavost a hygroskopičnost. Bioaerosem může být jak samotná spora, pyl, bakterie a vir, tak i biologické agregáty a vedlejší produkty připojené k částicím nebiologického původu. Velikostně se bioaerosoly pohybují od několika nanometrů do stovek mikrometrů.

Atmosférické proudy umožňují dálkový přenos bioaerosolu a tím i šíření genetického materiálu přes přírodní hranice, výměnu genetické informace mezi habitaty a biomy. Bioaerosoly jsou zodpovědné za vývoj, evoluci a dynamiku ekosystémů. Zároveň dálková distribuce např. pylu a spor hub má negativní dopad na zdraví společnosti a může ohrožovat zemědělské plodiny.

Významný podíl bioaerosolů tvoří pyly. Problematikou pylů se zabývá palynologie. K určení druhů pylu palynologové využívají optických nebo elektronových mikroskopů. Mnohdy je možné určit druh nebo rod na základě morfologické analýzy specifické struktury povrchu pylového zrna. Pylová zrna jsou samčí pohlavní buňky (gamety) nahosemenných a krytosemenných rostlin. Anemogamní (větrosprašné) rostliny využívají větru k dosažení sexuální reprodukce. Naopak rostliny entomogamní (hmyzosprašné) jsou opylovány prostřednictvím hmyzu. Uvolňování velkého počtu pylových zrn je podmínkou k oplodnění samičí gamety. Produkce pylu je patřičně větší u anemogamních rostlin, než u rostlin entomogamních. Například, prašník hmyzosprašného stromu rodu *Acer* (javor) produkuje 100 pylových zrn, zatímco prašník anemogamních rostlin rodu *Betula* (bříza) produkuje jich 10000 (Erdtman, 1954). Pyly větrosprašných rostlin tudíž v ovzduší převládají, a hmyzosprašná pylová zrna tvoří jen 2% celkového počtu (Ingold, 1971).

Tato práce má za úkol uvést do problematiky bioaerosolu v ovzduší, poskytnout informace o metodách jeho odběru a detekce, přehledně charakterizovat pylová zrna a jejich chování v atmosféře. Náplní práce je osvojit si techniku SEM analýzy, naučit se odlišovat pyly od jiných objektů a rozpoznávat základní typy běžně se vyskytujících pylových zrn.

Cílem této bakalářské práce je ověřit, zda pro odběr a analýzu bioaerosolu z volné atmosféry lze využít první stupeň vysokoobjemového kaskádního impaktoru BGI-900 (Hi-Vol). Kaskádní impaktor se obvykle používá pro stanovení distribuce polycyklických aromatických uhlovodíků na různě veliké částice atmosférického aerosolu a následné toxikologické testy. Pro stanovení cíle práce bylo nutné vypracovat metodiku separace bioaerosolu od impakčního substrátu HiVolu pro tvarovou analýzu skenovací elektronovou mikroskopií, zdokumentovat homogenitu připravených vzorků na filtru, určit původ pylových zrn, vyhodnotit případnou souvislost mezi početní a druhovou variabilitou bioaerosolu a hmotností aerosolu odebraného na třech lokalitách v České republice.

## 2. Rešeršní část

### 2.1. Bioaerosol

Bioaerosol je všudypřítomnou složkou ovzduší. Nedávné poznatky tvrdí, že v rurálních oblastech a deštných lesích atmosférický aerosol může obsahovat přibližně 30 % bioaerosolu z celkového počtu částic menších 1  $\mu\text{m}$  a až 70 % z celkového počtu částic větších 1  $\mu\text{m}$  (Elbert W. et al, 2007). Bioaerosol se může nacházet a tvořit jak ve venkovních podmínkách, tak i uvnitř budov (Leslie G.B, 2000). Na zdraví člověka ve vnitřním prostředí hlavním způsobem mohou mít vliv roztoči a produkty jejich metabolismu, biologické alergenů živočišného původu a mikroorganismy jako jsou např. viry, bakterie, plísňe, kvasinky a prvoky (Braniš M., Hůnová I., 2009). Naopak ve venkovním prostředí se mnohem častěji vyskytují pylová zrna, která jsou zodpovědná za alergické reakce (Rieger M., 1996). Alergie je onemocnění imunitního systému, při kterém dochází k přecitlivělé reakci na podněty zevního prostředí. Pyl lučních trav, plevelů a dřevin je schopen vyvolat zvýšenou citlivost organismu na alergizující látky pylu (Baloun et al., 1989).



### 2.1.1. Biologické zbraně

Využití bioaerosolu jako biologické zbraně není novým objevem. Existuje mnoho příkladů, kde bioaerosol byl využit k infikování nepřátel. Transport bioaerosolu vzduchem je nejúčinnějším způsobem jeho šíření. Aerosol se do ovzduší dostává z liniových zdrojů, které představují mobilní zařízení, jako jsou například automobily, letadla a lodě, a ze zdrojů bodových, které rozprašují aerosol jen kolem sebe. Rychlost větru a jiné meteorologické podmínky se podílí na sekundárním vznášení biologických látek, které i v malém množství mohou přinášet obrovské dopady (Agarwal R. et al, 2004). Jeden z odhadů síly působení biologických látek říká, že útok na velké město 50 kg sporami *Bacillus anthracis* by odnesl 95 tisíc životů ještě 125 tisíc lidí by onemocnělo (Klietmann W. F. et al, 2001). Pro porovnání s chemickými zbraněmi, 10 g spor *Bacillus anthracis* mohlo by zabít stejný počet lidí jako tuna nervově paralytické látky sarin (Primmerman Ch. A., 2000). Vzhledem k relativně snadné výrobě biologických zbraní a velkému počtu obyvatel potenciálně vystavených jejich působení, mohou být biologické látky využity jako zbraň hromadného ničení. Vniknutí aerosolů inhalační cestou je rychlejší a efektivnější než požití kontaminované stravy a vody nebo dermální expozice, a počet exponovaných lidí je nesrovnatelně větší (Shan J., Wilkins E., 2003).

### 2.1.2. Kondenzační/krystalizační jádra

V okamžiku uvolnění do ovzduší biologické částice podléhají fyzikálním a chemickým procesům jako koagulace, reakce s fotooxidanty, adheze k povrchům dalších objektů. Nedávný výzkum v Amazonii ukázal, že částice bioaerosolu hrají důležitou roli v klimatickém systému. Bioaerosol může rozptylovat sluneční záření a tím ochlazovat zemský povrch (nepřímý vliv) a v závislosti na povrchových vlastnostech, může poskytovat vodní páře jádra pro vznik vodních kapek (cloud condensation nuclei - CCN) nebo ledových krystalů (ice nuclei - IN), což vede k vytváření oblaků a srážek (Jimenez J. L. et al., 2009). V Amazonii se studovaly ranní mlhy v prostředí blízkém k přírodnímu, kde aerosolová zátěž nepochází z antropogenních zdrojů. Vzorky aerosolu o aerodynamickém průměru částic 0,1-1  $\mu\text{m}$  (akumulační mód) se odebíraly v květnu (vlhká sezona v Amazonii), a tento velikostní rozsah částic odpovídá velikosti vhodné pro kondenzaci vodní páry (Pöschl U. et al., 2010). Po rozboru mikrostruktury a chemického složení aerosolu

se zjistilo, že částice bohaté na draslík byly přítomny skoro ve všech vzorcích, což naznačovalo, že emise biogenních solí pocházely přímo z deštného lesu (Pöhlker C. et al., 2012).

V přírodě biologické částice s průměrem větším, než 10  $\mu\text{m}$ , jsou menšina. Mezi ně patří pyly a jejich části, fragmenty rostlin. Tyto částice mohou někdy vystupovat jako obří kondenzační jádra a tím urychlit koalescenci a vytvářet velké kapky (Mohler O. et al., 2007).

Eliminace bioaerosolu z atmosféry je možná cestou suché depozice (difuze, sedimentace) nebo mokré depozice jako kondenzační/krytalizační jádra nebo mechanické vymývání podoblačné oblasti). Potom částice bioaerosolu interagují s terestrickými a vodními ekosystémy a spouštějí biologickou aktivitu vedoucí k dalším emisím bioaerosolu do ovzduší (Després V., 2011).

## **2.2. Význam pylu**

### **2.2.1. Reprodukční funkce pylu**

Hlavní adaptivní funkcí pylu je dosáhnout a být přijatým bliznou květu a komplexní cestou dodat semeníku dva haploidních jádra. Úspěšný proces reprodukce podporuje přežití druhů a šíření genetického materiálu. Nicméně, doba funkčnosti pylových zrn je omezená. Pro pyly trav platí, že na dosažení blizny mají necelou hodinu. U jiných druhů může dojít k uvolnění relativně suchého pylu, což umožní přechod do dormantního stavu a prodlouží fyziologickou dobu života pylových zrn (Heslop-Harrison Y., 2000).

Usazení pylového zrna na jakýkoli povrch se zdá zcela náhodné, avšak přilnavost může být druhově specifická. Adhezi mohou podporovat unikátní proteiny nebo komplementárnost tvarů mezi pylovým zrnem a bliznou. Životaschopná pylová zrna začínají růst, pokud jsou smáčeny lepkavou tekutinou aktivně vylučovanou bliznou. Nedostatečná sekrece může vést k přerušení funkce pylového zrna, i když se může překonat relativní vysokou vzdušnou vlhkostí (Raven P.H. et al., 1999). Z hydratovaného pylového zrna během velice krátké doby po kontaktu s vhodnou bliznou vyklíčí pylová láčka. U některých druhů klíčení trvá 90 vteřin. Pylová láčka přenáší materiál intiny a rychle vrůstá skrz čnělku do semeníku. Následuje nekróza

výstelkových buněk pylové láčky, která je vyvolaná enzymatickou aktivitou a indukovanou apoptózou (Heslop-Harrison J., 1982).

### 2.2.2. Pylová alergie

Z antropocentrického hlediska pyly jsou významným alergenem. Alergie na pyl (polinóza) je jednou z nejčastějších alergických onemocnění ve společnosti. Alergické onemocnění postihuje skupinu lidí s genetickou predispozicí včetně dětí, u kterých alergické reakce jsou nejpočetnější. Od poloviny 20. století je sledován trend zvýšení počtu případů pylové alergie zejména ve městském prostředí vyspělých států (Reiger M., 1996). Pyly patří k inhalačním neboli vdechovaným alergenům. Většinou za alergickou reakcí jsou zodpovědné pyly přenášené prostřednictvím větru, tedy větrosprašné. Pyl hmyzosprašných rostlin může mít podstatný vliv při blízkém kontaktu např. při sběru květin. Alergie na pyl se projevuje slzením, dýchacími potížemi nebo astmatem (Novák J., Nováková H., 2010). Typicky je alergická reakce vyvolána pylem dřevin na jaře, pylem trav v létě a bylin v zimě. Nejčastějším projevem alergií způsobené pylem je senná rýma. Pro vznik projevů polinózy je dostačující koncentrace 10-20 pylových zrn na metr krychlový (Gamlin L., 2004).

### 2.2.3. Pylové sezóny

Pylová sezona je období, kdy kvetoucí rostliny aktivně produkují pylové alergeny. V České republice jsou pylové sezóny rozděleny na tři období: jarní, letní a podzimní. Pro začátek jara je typické kvetení stromů a keřů jako například líska, olše, jasan a další. V létě, tedy od května do srpna, jsou především významné pyly trav např. srha, lipnice, bojínek atd. Na podzim jsou nejvíce zastoupeny pyly bylin a plevelů, které kvetou od srpna do listopadu. Mezi ně patří ambrozie, pelyněk, jitrocel. V těchto tří sezonách jsou sledovány nejvyšší koncentrace pylů v ovzduší a nejvyšší výskyt pylových alergií u lidí. Termín začátku pylové sezony je ovlivněn počasím a nadmořskou výškou daného místa. Tudíž nelze jej přesně určit. V horských oblastech je pylová sezona je asi o měsíc opožděná (Novák J., Nováková H., 2010).

## 2.2.4 Pylová informační služba

Problematikou pylů se v České republice zabývá Pylová informační služba (PIS), která byla založena v Brně v roce 1992. PIS poskytuje lékařům a pacientům přesné informace o výskytu pylových alergenů v ovzduší a upozorňuje na změny složení pylů a vytváří předpovědi dalšího vývoje. Má to velký přínos v tom, že alergik se znalostí „svých“ pylů, může začít brát léky s předstihem a tím zabránit většímu dopadu na zdraví.

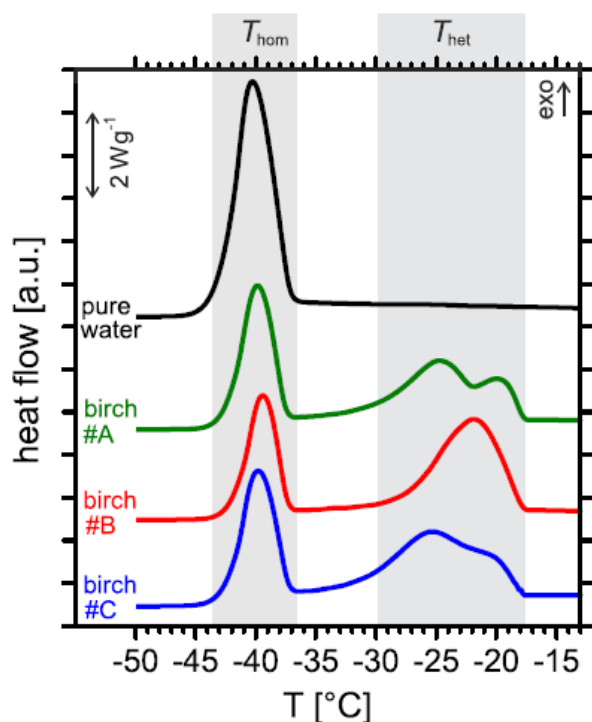
Pylový monitoring je významný i v dalších oborech jako jsou lesnictví, zemědělství a pomáhá při sledování šíření jednotlivých druhů rostlin (Rieger M., 1995).

V roce 1988 byla založena pylová databáze sídlící ve Vídni (European Aeroallergen network Server - EANS), na kterou jsou napojené pylové informační služby evropských států. Do této celoevropské databáze přispívají přes 250 pylových stanic. V ČR je celkem 12 stanic PIS, z toho je v trvalém provozu 11 stanic ([www.pylovasluzba.cz](http://www.pylovasluzba.cz)).

## 2.2.5 Pyly jako krystalizační jádra

Za vznik ledových krystalků v rámci bioaerosolu jsou zodpovědné především bakterie (Ice-nucleation active bacteria-INA), mikroskopické zbytky rostlin a pyly (Diehl et al., 2001). V atmosféře je tvorba ledových krystalků omezená rychlostí nukleace. V oblacích druhu Cirrus nukleace může být homogenní, avšak dominantní cestou tvorby krystalů ledu je heterogenní nukleace. Atmosférická heterogenní nukleace ledu je spuštěná přítomností krystalizačních jader, o nichž se dříve předpokládalo, že sestávají převážně z minerálních prachových částic. (Pruppacher, H. R., Klett, J. D., 1997). Nicméně nedávné terénní a laboratorní studie zdůraznily důležitost biologických částic v rozmezí nanometrů až mikrometrů pro tvorbu atmosférických krystalků ledu. Některé biologické částice, jako například bakterie, obsahují v buněčné membráně proteiny zodpovědné za tvorbu ledových krystalků. Jiné typy molekul jako lipoproteiny a polysacharidy, které podporují nukleační procesy (ice-nucleating molecules - INM), jsou známy již desetiletí. INM pocházejí z membrán bakterií, hmyzu, lišejníků a rostlin a nemusejí být navázány na částici, tj. ve formě rozpuštěných hydratovaných molekul nebo suspendovaných molekulárních klastrů mohou vystupovat jako krystalizační jádra. Například, některé

typy pylů (např. pyl břízy) uvolňují INM při kontaktu s vodou: aktivita krystalizace ve filtrátu se udržuje i bez původních pylových zrn (Pummer et al., 2012).



Obr. 1 Termogram homogenní a heterogenní nukleace vyvolané pylovými INM (Pummer et al., 2012)

Obrázek 1. představuje DSC termogram a demonstruje signály homogenní ( $T_{\text{hom}}$ ) a heterogenní ( $T_{\text{het}}$ ) nukleace v emulgovaných kapkách čisté vody (černá čára) a vzorcích filtrátu s obsahem INM pylu břízy (zelená, červená, modrá čára).

### 2.3. Koncentrace pylu v atmosféře

Obecně koncentrace pylových zrn klesá s výškou. V případě břízy se ukázalo, že koncentrace pylu ve výšce 2000 m klesla na 40% přízemné koncentrace (Rempe H., 1937). Tento obecný trend může být pozměněn vlivem inverzních vrstev (Linskens H. F., Jorge W., 1986).

Doba setrvání pylu v atmosféře závisí na rychlosti volného pádu, která je určena tvarem, hustotou a velikostí pylového zrna. Tyto parametry se značně liší u různých typů pylu (Digiovanni F., Kevan P. G., 1995).

Vniknutí pylu do atmosféry je dané dynamikou kvetení rostlin a klimatickými podmínkami. Během dne je koncentrace pylových zrn mnohem vyšší, než v noci. Po odkvetení rostlin, koncentrace pylu klesá, nicméně kvůli sekundárnímu

vznášení, pyly můžeme pozorovat v ovzduší až do září (Golovko V.V., Kirov E.I., 1999).

## 2.4. Transport pylu v ovzduší

### 2.4.1. Šíření větrem

Aerodynamický průměr pylu větrosnubných rostlin je typicky 15-58  $\mu\text{m}$  a v ovzduší se šíří zejména větrem (Stanley R., Linskins H., 1974). Obvykle je rozptýlen na dlouhé vzdálenosti v hojném počtu díky schopnosti ke vznášení (Straka H., 1975). Často je pyl uvolňován ve shlucích, které se usazují na nejbližší vegetaci a jsou unášeny větrem po vyschnutí (Jones A. M., Harrison R. M., 2004).

Horizontální vzdálenosti, na které pyl může být odnášen větrem závisí na převládající teplotě ovzduší. Nárůst teploty vzduchu může vyvolat atmosférickou nestabilitu a tím podpořit šíření pylu (Kuparinen A., Katul G., 2009).

Vzhledem k tomu, že bioaerosoly se produkují na zemském povrchu, v nejvyšším počtu se vyskytují v nejnižších vrstvách atmosféry. Z biologického hlediska je přízemní transport pylů zvláště důležitý (Fröhlich-Nowoisky et al., 2012).

Šíření pylu vzduchem je ovlivněno rychlostí větru a morfologickými charakteristikami pylu jako velikost a tvar a také přítomností vzdušných vaků, které jsou typické pro pylová zrna borovice (*Pinus*), smrku (*Picea*), jedle (*Abies*) a dalších (Erdtman G., 1969). Je obecně přijímáno, že většina pylů pochází z místních zdrojů (Sofiev et al., 2006), nicméně stále rostou důkazy dálkového transportu pylu (Ranta et al., 2006). Ačkoli většina pylových zrn klesá do 100 m od jejich zdroje, může dojít k šíření pylů na stovky kilometru (Gregory P. H., 1973). Dobře zdokumentovaný výzkum polinózy v pozdním létě ve Švýcarsku odráží transport pylu ze zdrojů, které se nacházejí ve Francii, přes Alpy (Frei T., 1997). Některé typy pylů mohou být šířeny atmosférickou cirkulací na velmi dlouhé vzdálenosti, například pyl borovice a smrku dokáže se unést více než na tisíce kilometrů, zatímco jiné typy pylu jako jsou pyly čeledí Slézovité (*Malvaceae*) a Lnovitě (*Linaceae*) se nešíří dále než několik metrů od mateřské rostliny (Erdtman G., 1969). Výzkum v Číně ukázal, že maximální vzdálenost mezi místem původu pylu a místem odběru vzorku činí 0,2-1,5 km pro rychlost větru 3,3 m/s a 200-1000 km pro rychlost větru 12,5 m/s. Tudiž, rychlost větru významně ovlivňuje transport pylu (Li et al. 2014). Další výzkum v Mongolsku prokázal, že pyly některých druhů lesních rostlin se můžou vyskytovat i v lokalitách,

kde nejbližší les se nachází ve vzdálenosti 40 km (Li et al. 2013). Jiný výzkum v Pekingu porovnával množství pylu v období s bouřkou a bez ní. Ukázalo se, že počet pylových zrn dřevnatých rostlin zůstává srovnatelný v obou případech, zatímco množství pylů bylin bylo největší za bouřek (Wang Z.H., Xu Q.H., 2006).

Do horních vrstev atmosféry se pyl dostává konvekčními proudy (Monin A. S. Obukhov A. M., 1954). Doba setrvání v atmosféře ovlivňuje schopnost pylu k dálkovému transportu (Ellstrand N. C., 1992).

#### 2.4.2. Šíření vodou

Vodní transport je dalším důležitým typem distribuce pylu. V období kvetení rostlin pylová zrna sedimentují na půdní povrch nebo jsou odnášeny větrem do jiných míst, kde se ukládají do svrchních vrstev půdy. Poté tento pyl je transportován spolu s dešťovou vodou do řeky. Kvalitativní složení pylu, který se přenáší vodou je naprosto odlišné od složení pylu šířeného vzduchem (Fall P. L., 1987),

Množství vstupujícího pylu v jezerech bez přítoku je menší, než s přítokem (Pennington W., 1979), což indikuje, že pyl přinesený řekou a tokem přispívá k množství stávajícího pylu. Za účelem empirického studia vlivů přítoku na výskyt pylů v jezerech byl vyvinut Taublerův lapač (Tauber H., 1967). Několik výzkumů v Evropě a Africe potvrdily, že přítoky řek mohou být hlavním zdrojem pylu v jezerním systému (Cross T. A. et al., 1966).

#### 4.2.3. Šíření hmyzem

Další možností šíření pylu je využití hmyzu. Pro hmyzosprašné druhy rostlin platí, že účinnost přenosu pylových zrn mezi květy je ovlivňována prostorovou distribucí rostlin, charakteristikami kvetu, jako např. velikost, barva a přítomnost nektarů, a také chováním opylovačů (Waser N.M., 1983). Nejčastěji je pyl usazen na bližší vegetaci a jen výjimečně se nachází na dlouhé vzdálenosti (Thomson J.D., Plowright R.C., 1980). Množství pylových zrn, které květ získává, koreluje s počtem opylovačů. Pravděpodobnost většího rozptýlu a depozici pylu se zvyšuje při vyšší hustotě kvetoucích rostlin (Sowig P., 1989). Pyl je zřídka odnášen opylovačem na vzdálenost, přesahující 200 m (Mayera C. et al., 2012).

## 2.5. Faktory ovlivňující výskyt pylu

Schopnost pylu rozptýlovat se v atmosféře závisí na několika parametrech. Šíření pylu závisí na jednu stranu na vznášení částic turbulentními proudy, na druhou stranu mají silný vliv meteorologické faktory. Například, přilnutí pylu k povrchům je ovlivňováno teplotou a vlhkostí (Jones, A. M., Harrison, R. M. 2004). Bylo také prokázáno, že počet pylových zrn rodu *Cupressus* vykazují významnou pozitivní korelaci s minimální, střední a maximální teplotou a zápornou korelaci s hojností srážek (Lo E., Levetin E., 2007). Nejvýznamnějšími parametry po teplotě a vlhkosti jsou vítr a déšť. Za srážek nebo slabého větru emise pylů se snižují (Ogden E. C., Hayes J.V., 1969).

## 2.7. Charakteristika pylového zrna

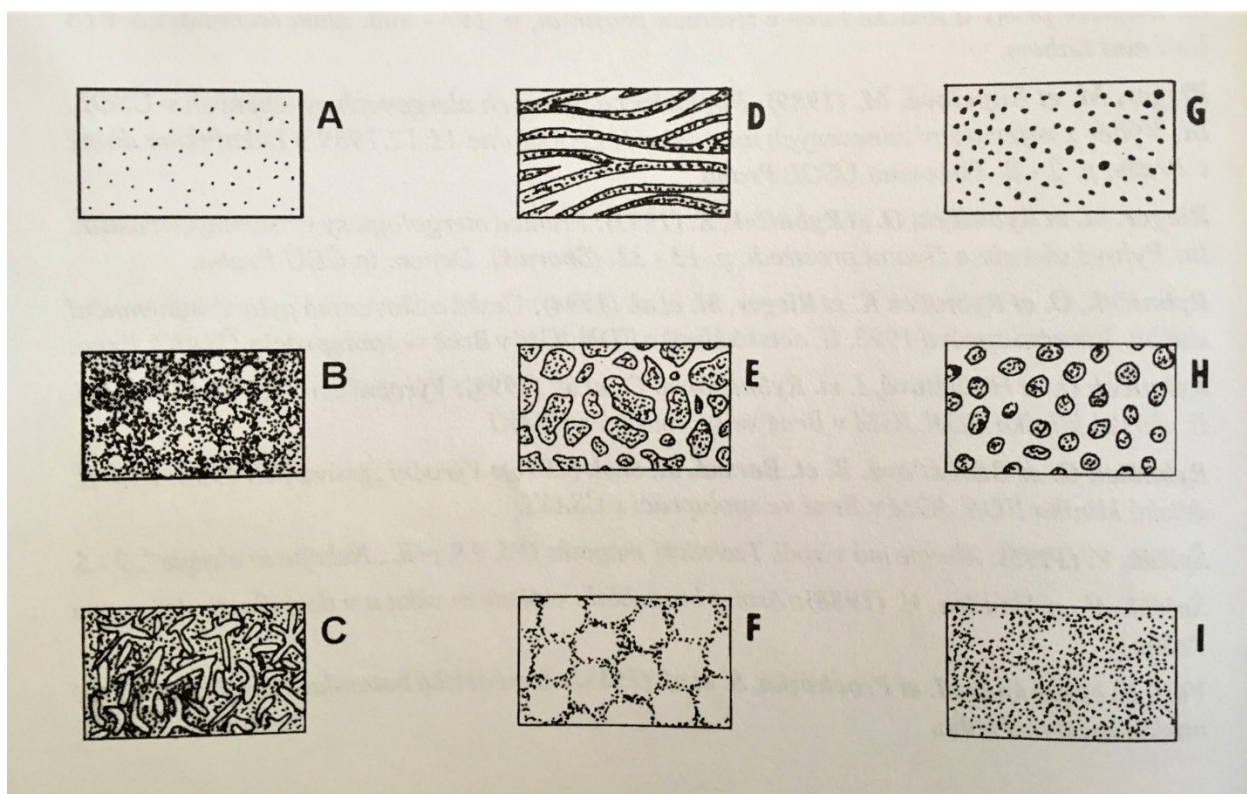
Pylová zrna vznikají v tetrádách, které mají proximální a distální polaritu. Polární osa prochází centrem pylových zrn a centrem tetrády. Proximální pól se nachází blíže k centru tetrády, zatímco distální je od ní oddálen. Existují i apolární pylová zrna, jejich polarita není rozlišitelná v jednotlivém zrně odděleném od tetrády. U některých rostlin např. modřínu (*Larix*), douglasky (*Pseudotsuga*), pyl vypadají apolárně, nicméně při bližším průzkumu je jejich polarita zřetelná (Erdtman G., 1952). Zralé tetrády se u většiny druhů rozpadají na monády, nicméně existují i výjimky jako např. *Empetrum nigrum*, *Vaccinium sp.* a další, které zůstávají pohromadě, a tak se dále šíří (Faegri K., Iversen J., 1989).

Nahosemenné rostliny mají bisakátní zrna, pro které je typická přítomnost dvou vzdušných vaků (sacci). Tento typ pylu je schopen cestovat na velmi dlouhé vzdálenosti díky využití vzdušného odporu. Tvar vzdušných vaků se liší u různých druhů. Porovnáním relativní vzdálenosti mezi tělem pylového zrna a vaky se dá zjistit jejich typ. V průběhu migrace pylová zrna se kvůli dehydrataci smršťují, a naopak při absorpci vody se zcela roztahují. Z expandovaného pylového zrna skrz aperturu, která se nachází uprostřed vzdušných vaků, vyklíčí pylová láčka (Iwanami Y. et al., 1988).

Většina pylů krytosemenných rostlin má sférický nebo elipsovitý tvar (Faegri K., Iversen J., 1989). Svoji stavbou pyl připomínají jiné rostlinné buňky. Uvnitř pylová zrna obsahují cytoplasmu, ohraničenou tenkou vrstvou celulózové membrány, která



se nazývá intina. Z vnější strany je zrno chráněno exinou. To je relativně tlustá stěna, která se skládá z dvou vrstev. Vnitřní bazální vrstva – nexina – nemá žádnou skulpturu, zatímco vnější – sexina – pro kterou skulpturní variabilita je typická. Různé typy pylových zrn se vyznačují charakteristickou skulpturou exiny (Obr. 2). A – psilate, B – scabrata, C – rugulate, D – striate, E – reticulate, F – verrucate, G – perforate, H – foveolate, I – echinate. Dále mohou být přítomné odlišné elementy, jako např. ostny nebo tyčinkovité útvary (Reiger M., Krauseová E., 1996).



Obr. 2 Typy struktury exiny (Rieger M., 1996)

Hlavní chemickou složkou exiny je sporopollenin, dále polymery a estery karotenoidů. Sporopollenin se vyznačuje obrovskou odolností. Odolává plameni o teplotě 500 °C a je rezistentní vůči kyselině sírové a lučavce královské (Iwanami Y. et al., 1988), které se používají pro rozpuštění obtížně rozpustných prvků a vzácných kovů (Mimura S. et al., 2016).

Vnější povrch exiny se vyznačuje velkou skulpturní variabilitou. Skulptura pylového zrna je víceméně konstantní charakteristikou, která je ve většině případů vynikajícím znakem pro identifikaci rodů pylu (Iwanami Y. et al., 1988).

Důležitým systematickým znakem jsou apertury pylů, což jsou klíčící otvory nacházející se v místech ztenčené nebo nepřítomné části exiny. (Faegri, 1989). V těchto místech je sporopollenin uložen v granulární podobě nebo v tenkých vrstvách, a tak intina je jen málo chráněna. Pyl krytosemenných rostlin má jednu nebo několik apertur. Při klíčení pylového zrna, pylová láčka projde přes některou z nich. Při kolísání vzdušné vlhkosti mohou apertury podléhat objemovým změnám. Existují dva základní typy apertur: póry a kolpy. Rozdíl mezi nimi je morfologický. Kolpy jsou podlouhlého a lodičkovitého tvaru, jejich konce jsou vždy víceméně ostré. Póry jsou většinou isodiametrické (mají stejný nebo téměř stejný průměr), i když jsou podlouhlé, konce takové apertury budou zaokrouhlené.

Pylová zrna mající jednu dlouhou kolpu se nazývají monokolpátní. Tento typ pylu je běžný u jednoděložných rostlin jako například u Lilie dlouhokvětě (*Lilium longiflorum*) nebo u primitivních krytosemenných jako je řád *Ranales*. U obrovské škály krytosemenných se vyskytuje pyl s třemi kolpy. Trikolpátní pylová zrna mají podlouhlé a stejně vzdálené apertury (Iwanami Y. et al., 1988).

Struktura pylového zrna může být poškozena vysokým environmentálním znečištěním. Pylová zrna vystavena vysokým koncentracím SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> a CO byla deformována. Ukázalo se, že tloušťka pylové stěny se významně snížila 2-3 krát, což vedlo k její destrukci (Meyer-Melikian N., Severova E., 1993).

### 3. Metody používané pro odběr vzorků bioaerosolu

Odborníci v mikroskopii stanovili přítomnost pylů v ovzduší v 18. století, a přesto atmosférické pyly nebyly vzorkovány do konce 19. století (Mullins J., Emberlin J., 1997). Vzorkování bioaerosolu vyžaduje dobré pochopení fyzikálních principů, které řídí interakce suspendovaných částic (<100 μm). Velikost částic je nejdůležitější charakteristikou pro správnou volbu vzorkovací metody (Nicholson, 1995). Zatímco malé částice (< 0.1 μm) jsou nejvíce ovlivněny Brownovým pohybem a elektrostatickými silami, větší částice (< 5 μm) více podléhají gravitačnímu usazování a setrvačným silám. Vedle toho, atmosférická turbulence může postihnout částici jakékoliv velikosti (Baron P.A., Willeke K., 2001).

Nejrozšířenější metodou pro vyhodnocování koncentrace pylů byly po mnoho let sedimentační lapáky. Později byly využívány vzorkovače určené především na vzorkování houbových spor a bakterií. Jedním z nejčastěji používaných byl Hirstův volumetrický lapač spor (Hirst spore trap) vyvinutý v roce 1952, který je založen na principu kaskádového impaktoru a navíc umožňuje odběr vzorku na lepkavou pásku otočného bubnu (Mullins J., Emberlin J., 1997). Jen několik málo vzorkovačů bylo vyvinuto výhradně pro vzorkování pylu. Vzhledem k velikostní podobě pylových zrn a spor hub palynologům bylo umožněno využití zařízení původně určených k odběru spor hub a bakterií k vizuální identifikaci pylů (Gregory P.H., 1973).

### **3.1. Sedimentační metody**

Kvůli potřebě identifikovat pylová zrna pod mikroskopem jako vzorkovací podložka byla upřednostněná lepkavá mikroskopická skla. Nejčastěji se sklo ukládalo horizontálně lepkavou částí nahoru v místě umožňujícím volné proudění vzduchu a zároveň chrání před případným deštěm. V polovině 20. století Gregory and Stedman zjistili, že tato metoda je velmi málo efektivní. Při proudění vzduchu okolo  $0,5 \text{ ms}^{-1}$  účinnost záchytu byla menší než 3 %, a dále klesala v případě zrychlení proudění. Tak po dosažení rychlosti  $9,7 \text{ ms}^{-1}$  účinnost usazování pylů klesla pod 1 %. Zdálo se, že velmi malé množství pylových zrn se ocitlo na sklu kvůli sedimentaci, a důležitější roli hrály turbulence a impakce.

Dále se zjistilo, že přední hrana skla vyvolávala vzestupné proudění, které mohlo úplně unášet pyl od vzorkovacího skla. Tento problém se vyřešil otočením skla tak, aby se nacházelo pod přímým uhlem k větru. Výsledkem bylo dosažení 27 % účinnosti záchytu díky srážkám pylových zrn se sklem. Nicméně při nižších rychlostech větru účinnost opět klesala (Gregory P. H., Stedman O. J., 1953).

K dlouhodobým měřením se používala Tauberova cylindrická past ke sběru pylu do otevřeného cylindru působením sedimentace. Tato past se ponořuje pod rovný povrch k zamezení hranového efektu a je užitečná při vzorkování ve vzdálených oblastech, kde cylindr může být nechán bez dozoru po dlouhou dobu (Tauber H., 1965).

Dalším vzorkovačem stejného typu je Durhamův lapač, který je sestaven z dvou umístěných nad sebou disků o průměru 22,7 cm. Lepkavý substrát je situován na

spodním disku, zatímco horní disk jej chrání před deštěm a slunečním zářením (Durham O. C., 1947).

Při použití sedimentačních vzorkovačů pro analýzu pylů je důležité umístění a výška nad terénem. Je zapotřebí vybrat si lokalitu tak, aby nebyla významně ovlivňována zdrojem znečištění (např. silnice, továrna). V případě příliš nízkého umístění vzorkovače může být proces narušen turbulentními proudy (Davies R.R. et al., 1963).

Nevýhodou sedimentačních metod je podceňování množství částic s aerodynamickým průměrem  $<20\text{ }\mu\text{m}$  (Charpin J. et al., 1974). Množství těžších částic jako jsou pylová zrna se často ve vzorcích naopak přeceňuje kvůli jejich rychlejšímu klesání. Výhodou sedimentace je snadné provedení a finanční dostupnost (Teřl M., Rybníček O., 2006).

### **3.2. Filtry**

Filtrace se většinou využívá v menších přenosných zařízeních, které můžou být připojeny k oděvům pracovníků. Tyto zařízení přináší reprezentativní informaci o osobním vystavení jednotlivce nebezpečnému bioaerosolu. Stejně jako větší zařízení osobní vzorkovače vyžadují čerpadlo, které by pohánělo vzduch přes něj a filtr, který umožní zachycení částic určité velikosti (Sykes D., 2005). Zachycené částice bioaerosolu lze poté převést na speciální desky nebo do roztoku k následné kultivaci nebo analýze pod mikroskopem. Vzorkování filtrací je běžný způsob sběru bioaerosolu, ačkoliv není tak populární kvůli vysušení vzorku.

Vláknité filtry používané v takových vzorkovačích se skládají z několika vrstev jemných vláken s relativně velkými mezerami, které umožňují průchod 70 % až 90 % vzduchu. Membránové filtry mají komplexní strukturu a pórovitost o 50-90 % menší než u vláknitých. Výhodou je, že membránový filtr je schopen zachytit i částice, které jsou menší, než póry filtru (Wu Y. et al, 2010)

### **3.3. Impingery**

Impingery jsou běžně používány pro odběr vzorků bioaerosolu. Kapalinové impingery byly zavedeny v roce 1914 úřadem veřejného zdraví ve spojených státech (United States Public Health Service) jako reakce na zdravotní problémy

spojené s rozvojem průmyslu (Greenburg and Bloomfield, 1932). Dokonalý impinger by musel mít vysokou účinnost odběru částic větších než  $0,1\ \mu\text{m}$ , umožňoval by odebrání vzorku delší dobu a nesnižoval životaschopnost mikroorganismů. Nicméně, dosáhnout rovnováhy mezi těmito parametry je obtížné. Životaschopnost bioaerosolu je také v impingeru ovlivňuje odpařování kapaliny (Henningson E.H., et al., 1988). V impingerech je důležitá kvalita vstupu atmosférického aerosolu. Vzorek by měl vstupovat do impingeru přímým tokem pro minimalizaci ztrát částic aerosolu (Hinds W. C., 1998).

### 3.4. Impaktory

Impakce je využívána k separaci částic z plynu, při které se využívá rozdílů v setrvačnosti různě velikých částic. Mírou velikosti částic je v tomto případě tzv. aerodynamický průměr. Ten je definován jako průměr hypotetické kulové částice o hustotě  $\rho = 1\ \text{g cm}^{-3}$ , která má stejnou finální pádovou rychlost ve stagnantní atmosféře jako sledovaná částice. Impaktor se skládá z několika pater. Částice o větším aerodynamickém průměru naráží na sběrný povrch vyššího patra, zatímco menší částice postupují v proudnici vzorkovačem do nižších pater (Hinds W.C., 1982).

Hirstův volumetrický lapač spor byl vyvinut z čtyřpatrového kaskádního impaktoru. Jako standardní vzorkovací plocha se v něm používají mikroskopická sklíčka posouvána mechanickým natahovacím strojkem. V tomto vzorkovači je vzduch nasáván štěrbinou o stejné velikosti jako v druhém patře kaskádního impaktoru a zachytává částice na lepivé sklíčko, které se pohybuje rychlostí 2 mm za hodinu. Tak po uplynutí 24 hodin posouvací páska je 48 mm dlouhá a reprezentuje koncentraci aerosolu během dne a noci. Trysky lapače spor podle Hirsta jsou před větrem a deštěm chráněny štítem. Na podobě tohoto vzorkovače byl dále vyvinut Burkardův vzorkovač (Burkard spore trap), ve kterém je možné využít plastové pásky jako substrátu, a plná rotace trvá 7 dní. V ideálním případě by vzorkovací tempo odpovídalo rychlosti větru, tak by bylo dosaženo maximální účinnosti vzorkování. Nicméně, v praxi takové podmínky nejsou dosažitelné kvůli náhlým změnám rychlosti větru. Účinnost zachytu částic při nasávání  $10\ \text{l min}^{-1}$  vzduchu se pohybuje v rozmezí od 68 do 85 %, přičemž dosahuje 70 % účinnosti při rychlosti větru  $6\ \text{ms}^{-1}$  (Mullins J., Emberlin J., 1997).

## 4. Metody používané pro identifikaci pylu

### 4.1. Optická mikroskopie

Optická mikroskopie je nesmírně důležitou technikou pro výzkum bioaerosolu a zůstává hlavním nástrojem k analýze pylů (Spurny K.R., 1994). Musí se ale brát v úvahu, že částice menší než 2  $\mu\text{m}$  jsou viditelné jako tečky a není možné detailně zkoumat jejich tvar a strukturu. Vzorky bioaerosolu odebrané pomocí sedimentace nebo impakce mohou být přímo analyzovány. Pokud je vzorkovač volumetrický, může být koncentrace vzorku opticky kvantifikována. V optické mikroskopii se často používají tradiční barviva pro usnadnění určení druhu či rodu částice bioaerosolu (Matthias-Maser S., Jaenicke R., 1989).

### 4.2. Elektronová mikroskopie

SEM analýza je zvláště užitečná ve výzkumu bioaerosolu. Umožňuje detailní zkoumání morfologie a povrchu částic (Karlsson K., Malmberg P., 1989). Vzhledem k tomu, že standardní průměr pylového zrna je okolo 30  $\mu\text{m}$ , jemná struktura povrchu nemůže být pozorována optickým mikroskopem, který ukazuje jen výstupky a brázdy. Tak pod nízkým zvětšením pylové zrna rýže vypadá jako malá lodička s hladkým povrchem. Při větším zvětšení se mohou na povrchu rozlišit černé skvrny obklopené síťovitou strukturou. Nicméně není pod optickým mikroskopem rozlišitelné, zdá jsou tyto skvrny konkávní (vyduté) nebo konvexní (vypuklé). Podle pozorování optickým mikroskopem, pylové zrna rýže je v běžných učebnicích přiřazeno ke skupině pylů s tenkou povrchovou vrstvou. Zatímco pod skenovacím elektronovým mikroskopem se ukazují černé skvrny jako granulární výdutě. Tudíž pozorování pod optickým mikroskopem je nutno přehodnotit za využití mikroskopu elektronového, který poskytuje jemné rozlišení a rozsáhlou hloubku ostrosti (Iwanami Y., 1988).

### 4.3. Amplifikace DNA (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je biochemická metoda pro rychlou reprodukci několika kopií určitého úseku DNA (Lim D. V., 2005). S využitím amplifikace DNA Wakefield v roce 1996 byl schopen zaznamenat přítomnost v ovzduší patogenní houby *Pneumocystis carinii*, kterou našel ve vzorcích, odebraných kaskádním

impaktorem. Použití této techniky umožňuje přesnou identifikaci pylu na úrovni druhů. Současné metody identifikace závisí na vlastnostech pylu viditelných pod světelným mikroskopem, který v případě pylů trav neumožňuje identifikaci ani na úrovni rodu (Wakefield A. E., 1996).

#### **4.4. Laserem indukovaná fluorimetrie (LIF)**

Laserem indukovaná fluorimetrie (LIF) je spektrometrická metoda obvykle používaná ke studiu struktury molekul nebo detekci selektivních druhů bioaerosolu. Využívá emisí fluorescence z povrchu biologického materiálu, která je vyvolána laserem. LIF poskytuje kvantitativní, nedestruktivní a in situ detekci ve skutečném čase (Burrows S.M. et al., 2009). Technologie na bázi LIF jsou schopny identifikovat mnoho druhů bioaerosolů (Zare R. N. et al, 2012). Nevýhodou fluorimetrie je to, že biologické částice vykazující slabou fluorescenci nebudou započítané do výsledku (Huffman J.A. et al., 2012) a některé nebiologické fluoreskující částice jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a sekundární organický aerosol (SOA) mohou pozitivně zkreslovat výsledek (Bones D. L. et al., 2010).

### **5. Metodika**

#### **5.1. Vysokoobjemový kaskádní impaktor (Hi-Vol)**

Aerosol byl odebírán velkoobjemovým kaskádním impaktorem (BGI-900, USA) , který třídí aerosol podle aerodynamického průměru částic -  $d_{ae}$  do pěti velikostních frakcí. 1. frakci o  $d_{ae} > 10 \mu m$ , 2. frakci, v které je  $1 < d_{ae} < 10 \mu m$ , 3. frakci, v které je  $0,5 < d_{ae} < 1 \mu m$ , 4. frakci, kde je  $0,17 < d_{ae} < 0,5 \mu m$  a 5. frakci o  $d_{ae} < 0,17 \mu m$  (Obr.3).

Aerosol frakcí 1-4. byl zachytáván na polyuretanovou pěnu (PUF) zatímco 5. frakce na skleněné mikrovláknové filtry potažené PTFE (Pallflex TX40). Vzduch je do impaktoru nasáván přes tři úzké trysky, jejichž rozměr při vstupu do 1. frakce činí  $10,99 \times 0,759 \text{ cm}$ , a tak se na polyuretanové pění se vytváří tři pruhy zachyceného aerosolu. K analýze bioaerosolu bylo použito 1. frakce. Při celkovém průtoku impaktorem 900 LPM je rychlost průtoku vzduchu tryskami 1. patra  $600 \text{ cm s}^{-1}$  a pokles tlaku 0.25 kPa (Demokritou P. et al., 2002). Hodnoty jsou nižší nežli u impaktorů používaných pro odběr bioaerosolu (Wittmaack et al, 2005) a lze tak

předpokládat nízký stupeň poškození bioaerosolu technikou odběru. Integrační doba odběru vzorku byla obvykle dva dny, což zhruba odpovídá objemu prosátého vzduchu 2500 m<sup>3</sup> (Tab. 1). Před zahájením odběru dle manuálu výrobce (BGI 900 High Volume Cascade Impactor, Guidance Manual, 2008) PUF se čistil třístupňovou extrakcí a byl sušen po dobu několika dní v čistém boxu. Poté byl PUF, po ekvilibraci v exsikátoru při 50% vlhkosti vzduchu, před a po expozici byl zvážen na analytických vahách Sartorius. Poté byl rozříznut na tři části, zabalen do alobalu a dvojitého plastového ZIP sáčku a schován v pultové mrazničce při teplotě -22 °C.



>10 µm

1-10 µm

0.5-1 µm

0.17-0.5 µm

<0.17 µm

Obr. 3 Vysokoobjemový kaskádní impaktor BGI-900



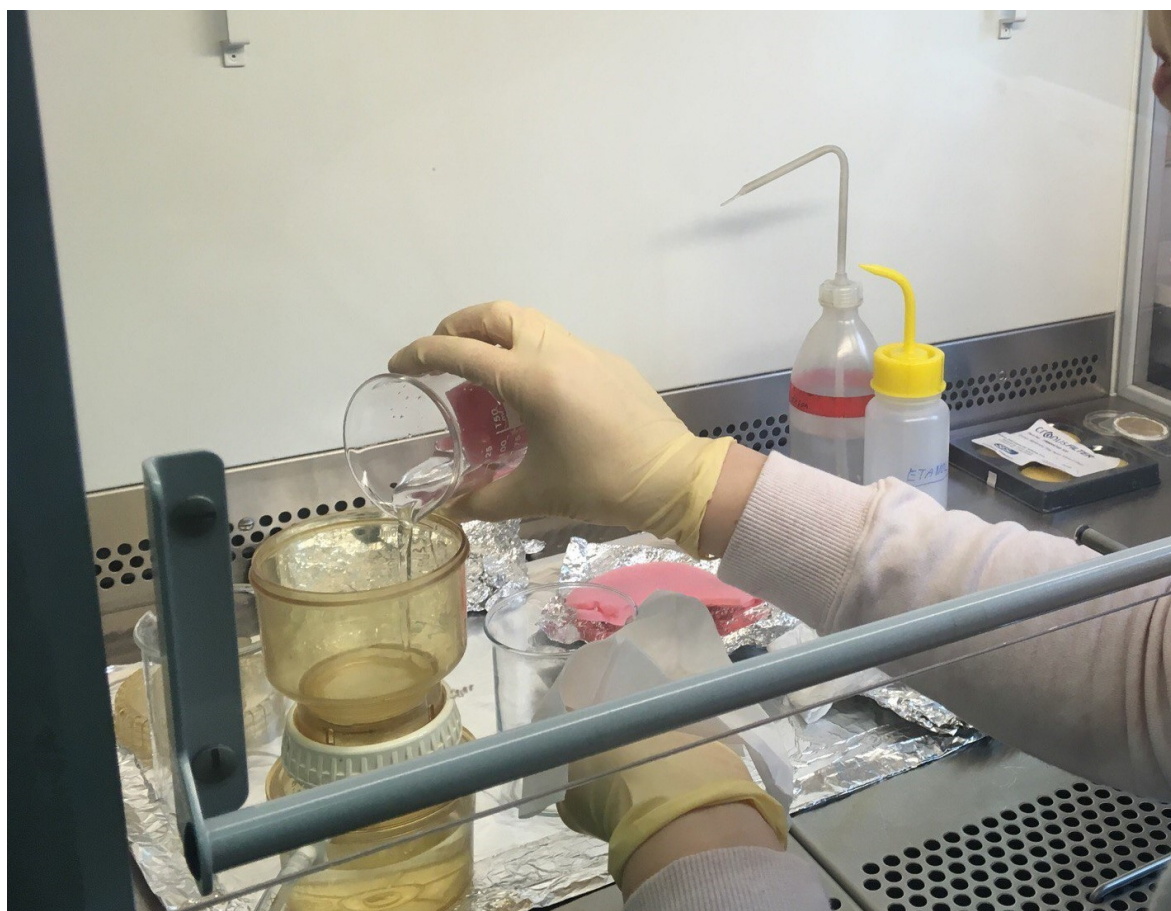
*Tabulka 1 Základní informace o provedených odběrech vzorků: GPS lokalit;  
Začátek a konec odběru; Objem prosátého vzduchu; Navážka aerosolu*

Lokalita GPS	Číslo vzorku	Začátek odběru	Konec odběru	Doba odběru (min)	Objem (m3)	Navážka aerosolu (mg)
Praha 50°4'16.638"N, 14°25'15.305"E	29A	5.6.09 12:16	7.6.09 10:23	2767,0	2490,3	11,3
	31A	9.6.09 11:10	11.6.09 10:55	2865,0	2578,5	10,7
	32A	11.6.09 11:35	13.6.09 10:30	2815,0	2533,5	7,4
	33A	13.6.09 11:07	15.6.09 11:30	2903,0	2612,7	12,6
Březno 50°24'0.545"N, 13°25'19.909"E	38A	7.8.09 13:25	9.8.09 10:58	2733,0	2459,7	32,8
	39A	9.8.09 11:45	11.8.09 10:12	2787,0	2508,3	37,1
	40A	11.8.09 10:58	13.8.09 9:40	2802,0	2521,8	16,1
	42A	15.8.09 10:03	17.8.09 9:30	2847,0	2562,3	31
Láz 49°39'35.206"N, 13°53'43.743"E	45A	24.8.09 11:55	26.8.09 10:55	2820,0	2598	<0
	46A	26.8.09 11:25	28.8.09 10:40	2835,0	2551,5	<0
	47A	28.8.09 11:06	30.8.09 10:00	2814,0	2532,6	<0
	48A	30.8.09 10:30	1.9.09 10:32	2882,0	2593,8	9,7

## 5.2. Separace aerosolu

Veškeré manipulace se vzorky probíhaly ve flowboxu Holten LaminAir HB2436, který zajišťoval cirkulaci čistého vzduchu a zamezoval vniknutí částic z okolního prostředí. K zabránění vniknutí nečistot prostřednictvím rukou, byly použity jednorázové rukavice bez klouzku.

Každý vzorek obsahoval tři proužky substrátu PUF. U prvního vzorku č. 29A se prováděla separace pro každý proužek zvlášť pro zabránění překrývání se částic aerosolu na filtru. V ostatních případech se použily všechny tři proužky na jeden filtr.



Obr. 4 Filtrační zařízení, substrát PUF ve Flowboxu Holten LaminAir HB2436

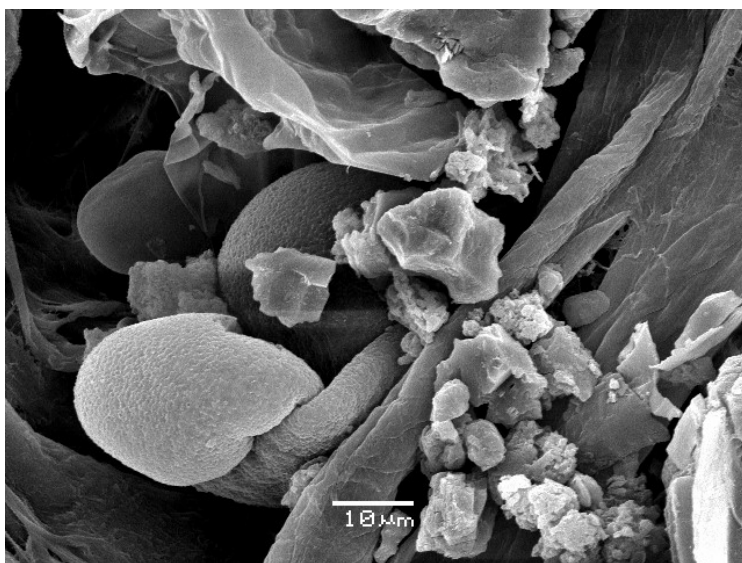
Se vzorky se manipulovalo pinzetou. Proužky byly rozříznuty na menší části o velikosti cca 1 cm<sup>2</sup> pro zmenšení celkového objemu a převedeny do 150 ml kádinky. Následně PUF byl smočen pár kapkami etanolu pro lepší smáčení vodou a snadnější uvolňování částic, který nemůže poškodit bioaerosol. Kádinka se doplnila deionizovanou vodou na objem cca 100 ml, tak, aby se části polyuretanové pěny

nacházely pod hladinou. První vzorek č. 29A byl separován pro porovnání bez použití ethanolu. Následně kádinka s PUFem byla umístěna do ultrazvukové lázně Micro Ultrasonic Cleaner CT-400 po dobu tří minut při maximálním výkonu 60 W. Občas se PUF v kádince promíchal a pomačkal kovovou kopistkou. Poté roztok aerosolu byl vylit do filtračního zařízení Heto SUE 300Q (Obr. 4), a proces loužení se ještě jednou opakoval. Počet loužení se optimalizoval podle zabarvení filtru 29A. Použitý PUF z kádinky byl odstraněn pomocí kovové kopistky a pinzety, a roztok byl přelit do nádoby filtračního zařízení.

### 5.3 Filtrace

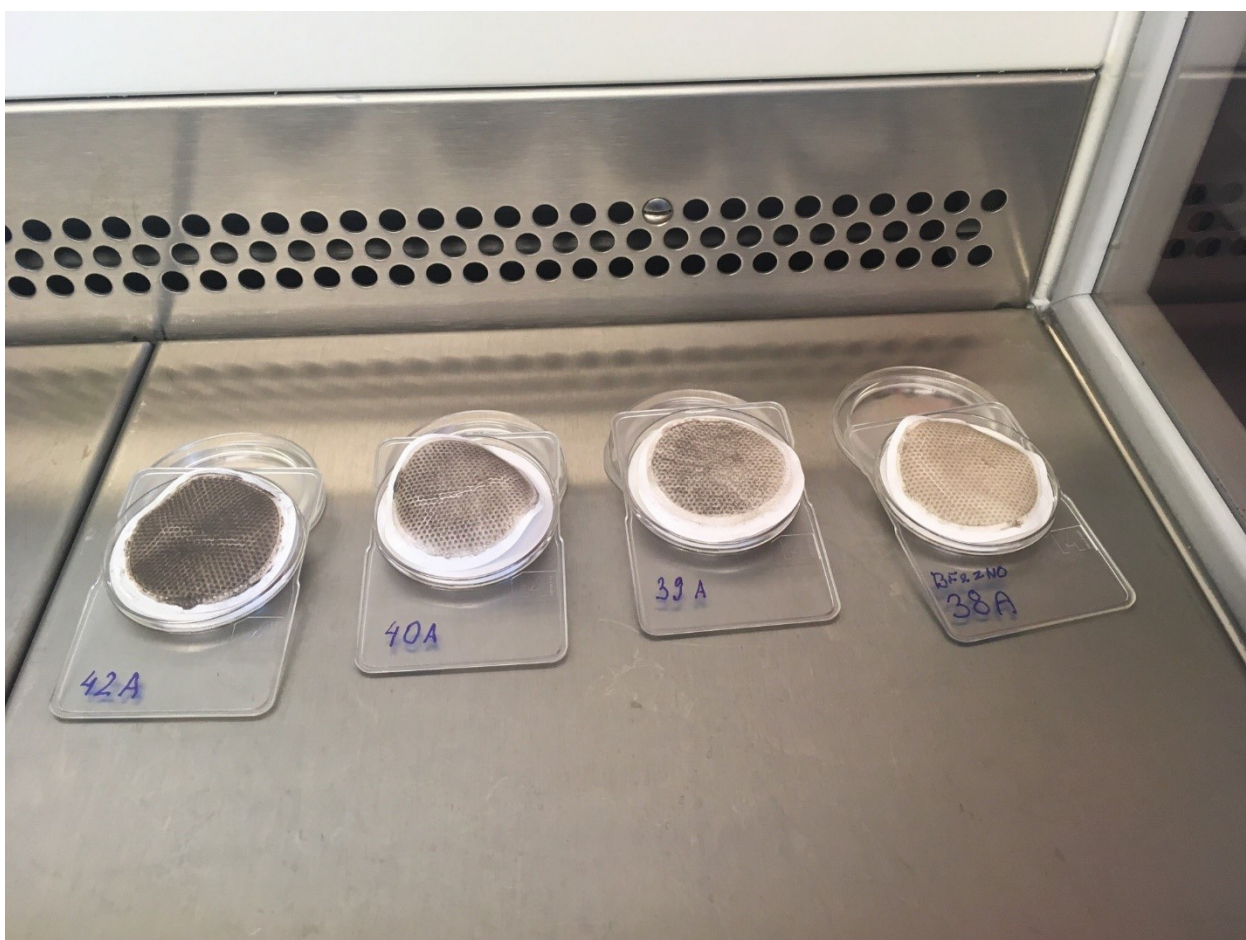
Před začátkem filtrace stěny nádoby filtračního zařízení a filtrační podložka byly nejdříve smáčeny deionizovanou vodou. Poté do filtračního zařízení byl pinzetou vložen filtr, který byl také namočen. Nádobka filtračního zařízení se zafixovala, a na spodní část nádoby, která kumuluje přefiltrovanou vodu, byla nasazena ucpávka. Teprve v tomto kroku vzorek roztok vzorku se přelil do filtrační nádoby.

Nejprve byl přefiltrován první proužek vzorku 29A přes papírový filtr Whatman s průměrem 42,5 mm. Při následné SEM analýze se zjistilo, že papírový filtr kvůli své struktuře není vhodný pro rozpoznání jednotlivých částic bioaerosolu, tj. docházelo k překrývání částic samotným filtrem (Obr. 5). Všechny další vzorky, včetně dvou zbylých proužků vzorku 29A, se filtrovaly přes nylonový filtr Cronus Membrane Filter Nylon o průměru 47 mm a rozměru pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .



Obr. 5 Struktura papírového filtru Watman s obsahem minerálních a organických částic

Po ukončení procesu filtrace, filtr byl pečlivě přemístěn pinzetou na víčko přenosné plastové Petriho misky (Petri Slide) s průměrem 47 mm, která byla předem popsána příslušným číslem vzorku (Obr. 6). Filtry se sušily ve flowboxu po dobu minimálně jedné hodiny. Po vysušení se vzorky uschovali do Petriho misek, dále do ZIP sáčků a byly následně zabaleny do alobalové folie a popsány.



Obr. 6 Aerosol na nylonových filtrech

### 5.3. SEM analýza

Nejdříve byl připraven hliníkový podložní terčik, který se směl vzít jen ze stran a v jednorázových rukavicích bez prášku pro zabránění přenosu případné mastnoty nebo nečistot. Podložní terčik odstraňuje náboj, teplo a je velice vodivý, proto je důležité dbát na jeho čistotu. Pomocí pinzety a nůžek se na podložní terčik nalepily dva proužky oboustranné uhlíkové lepicí pásky.

Z vysušeného filtru se vystříhla reprezentativní oblast obdélníkového tvaru o rozměru přibližně 1x2 cm. Filtr se při manipulaci zvedal pinzetou jen mírně a



opatrně, aby nedošlo k rozprašování částic bioaerosolu. Dále vystřižnutá část byla pinzetou přenesena na lepící plochu pásek a jemně přitlačena k jejich povrchu. Poté hliníkový terčík byl pokovován vrstvou zlata 1 nm ve vakuové naprašovací aparatuře BAL-TEC SCD 050 při teplotě 23 °C po dobu 5 min. Pozlacený preparát byl pinzetou vložen do skenovacího elektronového mikroskopu JEOL JSM-6380LV. Práci s počítačovým programem SEM Control User Interface byla provedena některá vylepšení jako např. regulace kontrastu a jasu, zrnitosti obrázku nebo změna tzv. spot size. Po každé půlhodině používání mikroskopu nebo po výměně vzorku bylo nutné doostřit obraz na nejsilnějším zvětšení x300000.

## 5.4. Lokality

### 5.4.1. Praha

GPS: 50°4'16.638"N 14°25'15.305"E

Odběr vzorků se uskutečnil na střeše budovy Katedry botaniky a Ústav pro životní prostředí Přírodovědecké fakulty UK (Obr. 7). Budova se nachází v areálu Botanické zahrady. Vysokoobjemový kaskádní impaktor se situoval ve výšce 25 m nad terénem. Vybraná lokalita reprezentuje aerosol pražského centra. Nalezené typy pylů jsou typické pro Prahu. Vzhledem k tomu, že botanická zahrada reprezentuje vzácnější a méně rozšířené rody rostlin, vycházím z předpokladu, že pylová zrna pocházející z vegetace botanické zahrady neovlivnila složení bioaerosolu.

### 5.4.2. Březno

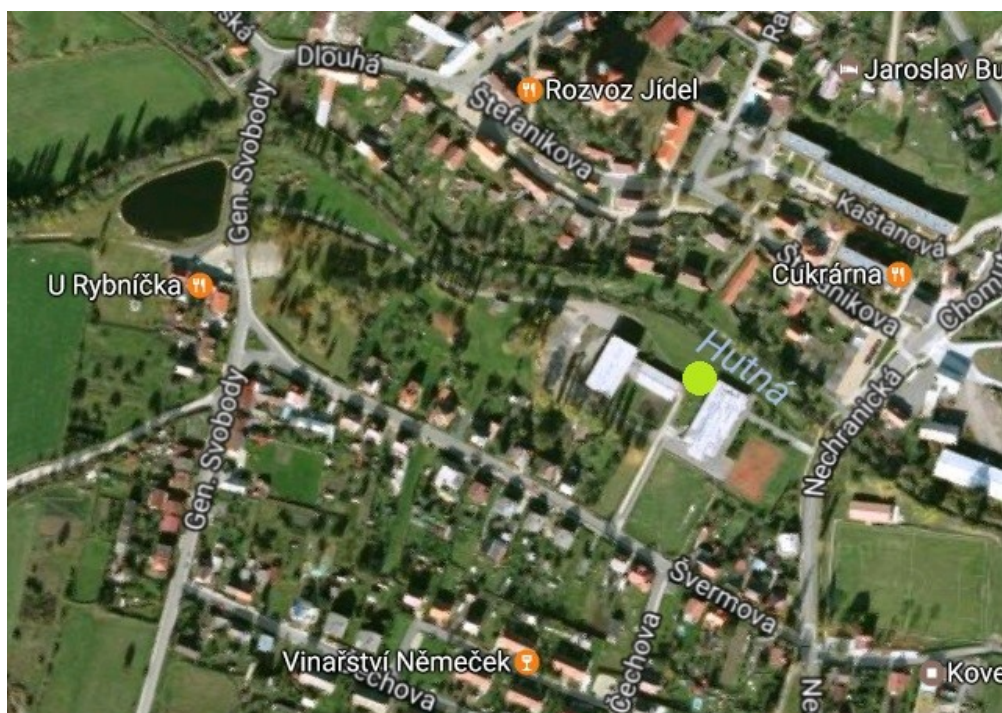
GPS: 50°24'00.6"N 13°25'19.9"E

Obec Březno leží v Podkrušnohoří a nachází se ve vzdálenosti 7 km od města Chomutov. Počet obyvatel činí okolo 1300 lidí ([www.czso.cz](http://www.czso.cz)). V blízkém okolí se nenacházejí žádné větší lesní porosty. Nejbližší les se nachází ve vzdálenosti okolo 600 m od umístění impaktoru. Ten byl situován ve výšce cca 4m nad travnatým terénem před školou (Obr.8).

Pravděpodobně všechna pylová zrna nalezená na tomto území pocházejí z místních zdrojů. Ve vzorcích z obce Březno bylo nalezeno nejvíce polétavého prachu. Toto je nejpravděpodobněji spojeno s resuspencí silničních prachu a půdy.



Obr. 7 Satelitní snímek lokality v Praze. Zelený bod představuje umístění impaktoru. (google.cz/maps)



Obr. 8 Satelitní snímek lokality v obce Březno. Zelený bod označuje umístění impaktoru. (google.cz/maps)

### 5.4.3. Láz

GPS: 49°39'35.206"N, 13°53'43.743"E

Vodní nádrž Láz je vybudovaná na území Vojenského újezdu Brdy nedaleko Příbrami a nachází se okolo 1 km západně od obce Láz v lesnatém údolí v Brdech. Brdy se vyznačují přítomností chladnomilných druhů a biotopů, nicméně zde se mohou najít i druhy teplejších oblastí. Pro tuto oblast jsou charakteristické druhy Alpských migrantů, např. dřívátka horská (*Soldanella montana*). Je typický výskyt třtinových smrčů, rohozcových a rašeliníkových smrčů a rašelinné březiny ([www.brdy.ochranaprirody.cz](http://www.brdy.ochranaprirody.cz)).

Impaktor byl na hrázi údolní nádrže na pitnou vodu Láz umístěn na střeše stanice ve výšce 4 m nad zemí (Obr. 9).

Na této lokalitě by se dál očekávat nejvyšší výskyt pylových zrn v jarních měsících. Nicméně, odběr vzorku byl proveden od 24. srpna do 1. září. V tomto období s velkou pravděpodobností se mohou vyskytovat pylová zrna zejména bylin a plevelů.



Obr. 9 Satelitní snímek lokality Láz. Zelený bod označuje umístění impaktoru ([google.cz/maps](http://google.cz/maps))

## 6. Výsledky a diskuze

### 6.1. Morfologická analýza

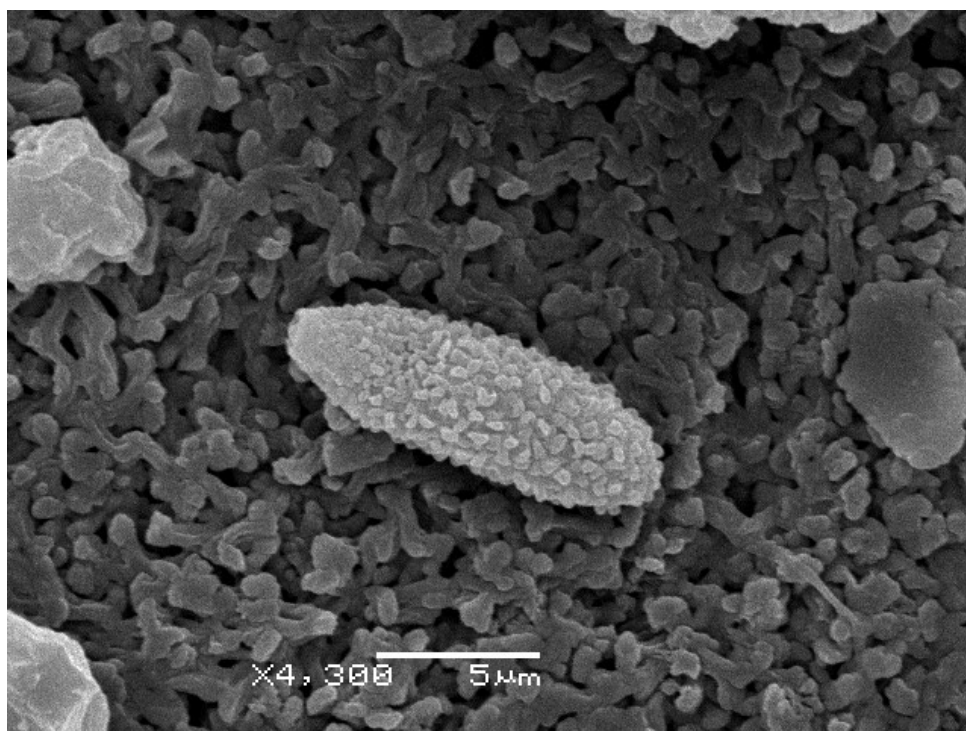
Pylová zrna byla identifikována na základě charakteristického tvaru, velikosti, povrchové skulptury, typu, struktury a umístění apertur. K identifikaci pylových zrn se použily následující klíče:

1. Iwanami Y., Sasakuma T., Yamada Y. Pollen: Illustrations and Scanning Electromicrographs. 1988



2. Erdtman G. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Anigospersms. In Introduction In Palynology. 1952
3. Bassett J., Crompton C.W., Parmelee J. A. An Atlas of Airborne Pollen Grainsand Common Fungus spores of Canada. 1978
4. Jonas F. Atlas zur Bestimmung rezenter und fossiler Pollen und Sporen. 1952
5. Spieksma F. T. M., Nolard N., Frenguelli G., Van Moerbeke D.: Pylový atlas Evropy. 1996

Celkem jsme vytvořili 485 SEM fotografií částic bioaerosolu. Z nich 290 byly identifikovány jako pylová zrna. Ostatní podíl organické hmoty tvořily především houby (Obr. 10) a jejich spory, části rostlin, hmyzí brochosomy (Obr. 11) a další organické objekty, které se nepodařilo rozpoznat. Značnou část aerosolu tvořily anorganické hrubé aerosoly, jejichž největší množství jsme pozorovali ve vzorcích z lokality Březno.



Obr. 10 Přítomná ve vzorku houba rodu *Cladosporium*

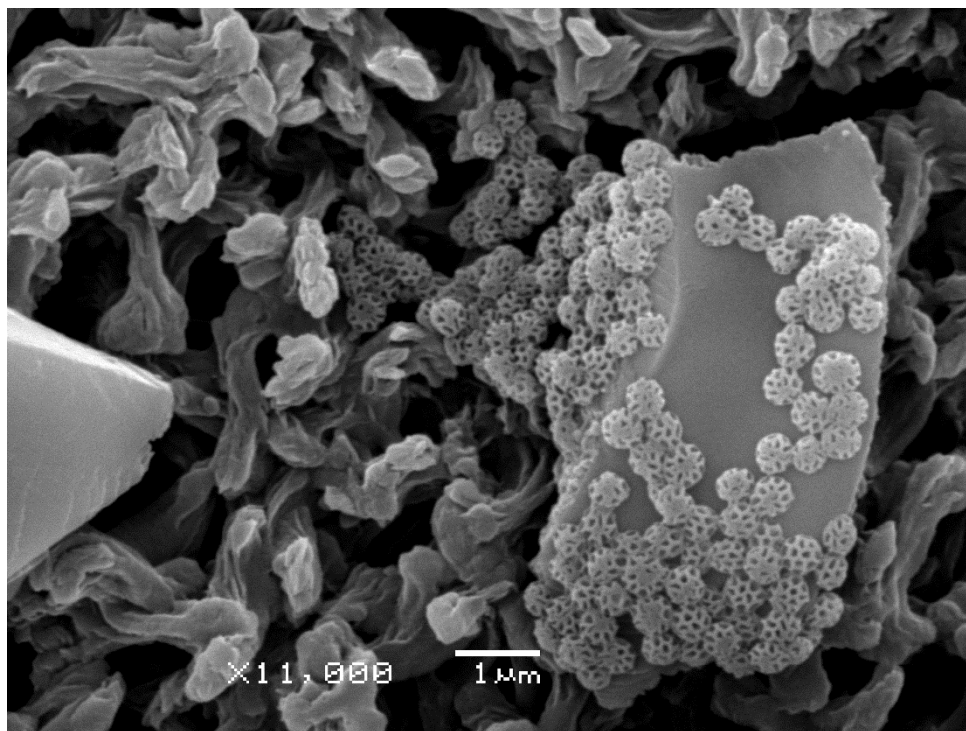
V Praze se odběr uskutečnil od začátku do poloviny června. Na této lokalitě byla objevena nejvyšší početnost pylových zrn. To je nejpravděpodobněji spojeno



s obdobím kvetení rostlin. Informace o měsících kvetení byly získány z pylového kalendáře na portálu pyly.cz (Tab. 2).

Tabulka 2 Období kvetení podle pylového kalendáře pyly.cz

Název rodu rostliny	Období kvetení
Olše	Únor-duben
Lípa	Červen-červenec
Vrba	Březen-květen
Laskavec	Červen-říjen
Borovice	Duben-červen
Javor	Duben-květen
Buk	Duben-květen
Dub	Duben-červen
Jilm	Duben-květen



Obr. 11 Přítomné ve vzorku *Brochosomy* hmyzu

Některé typy pylových zrn se nepodařilo určit přesně do rodu kvůli vysoké početnosti v rámci čeledi a velké morfologické shodě pylových zrn. Například, ve vzorcích se

vyskytovala pylová zrna rostlin čeledí *Rosaceae*, *Poaceae*, *Caryophyllaceae*, *Brassicaceae*.

Některá pylová zrna nebylo možné identifikovat kvůli vzniklým deformacím při odběru vzorků nebo procesům degradace struktury pylového zrna. Často byla pozorována pylová zrna s chybějící částí nebo naopak např. úlomek pylové exiny.

Potíže při určení dále představovaly částice anorganického aerosolu, které se vážaly na povrch pylových zrn.

Na lokalitě Březno se odběr prováděl od začátku po polovinu srpna. Kvůli tomu, že většina rostlin v tomto období již odkvetla, nepředpokládali jsme objevit ve vzorcích velké množství pylů. Vzorky se vyznačovali velkým množstvím anorganického aerosolu, který obarvil polyuretanový substrát a následně i nylonové filtry hnědě až černě (Obr. 6). Co se týče množství pylových zrn, na této lokalitě se vyskytovaly v nejmenším počtu.

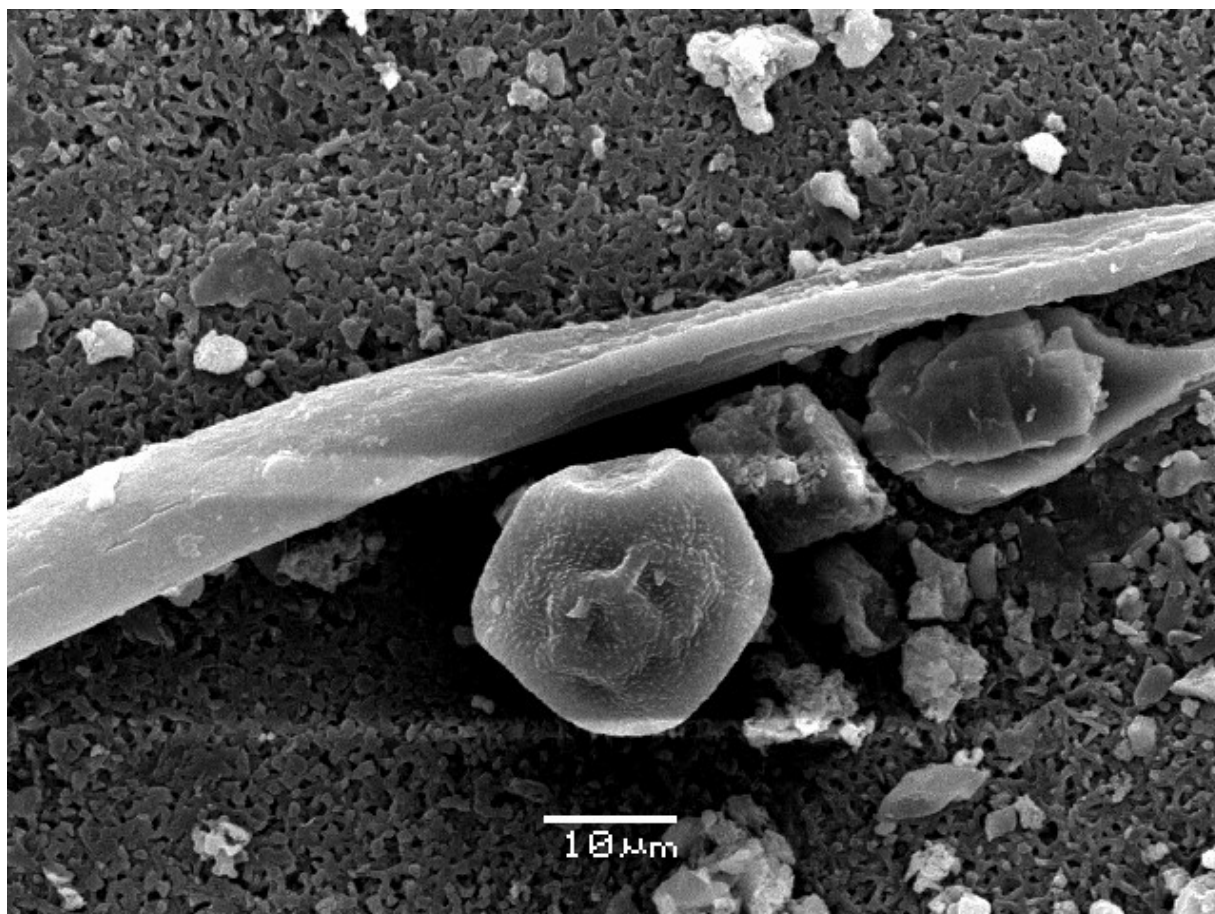
Zde se našlo jen 7 druhů pylu, nejzastoupenější čeledí byla lipnicovité (*Poaceae*), dále se našly pyly z čeledi břízovité (*Betulaceae*), laskavec (*Amaranthus sp.*) a pyly rodu líčidlo (*Phytolacca sp.*).

Vzorky na lokalitě Láz se odbíraly nejpozději, a to koncem srpna. Zde se objevil mnohem vyšší počet hub, než v předchozích dvou případech. Vzhledem k rozsáhlým porostům obklopujícím místo odběru a nízké umístění impaktoru, jsme očekávali hodnoty koncentrace srovnatelné s Pražskými vzorky. Nicméně, průměrná koncentrace pylových zrn byla ještě menší než v Praze. Zatímco koncentrace pylů v Praze postupem času klesaly, v okolí vodní nádrže Láz přetrvávaly na podobné úrovni.

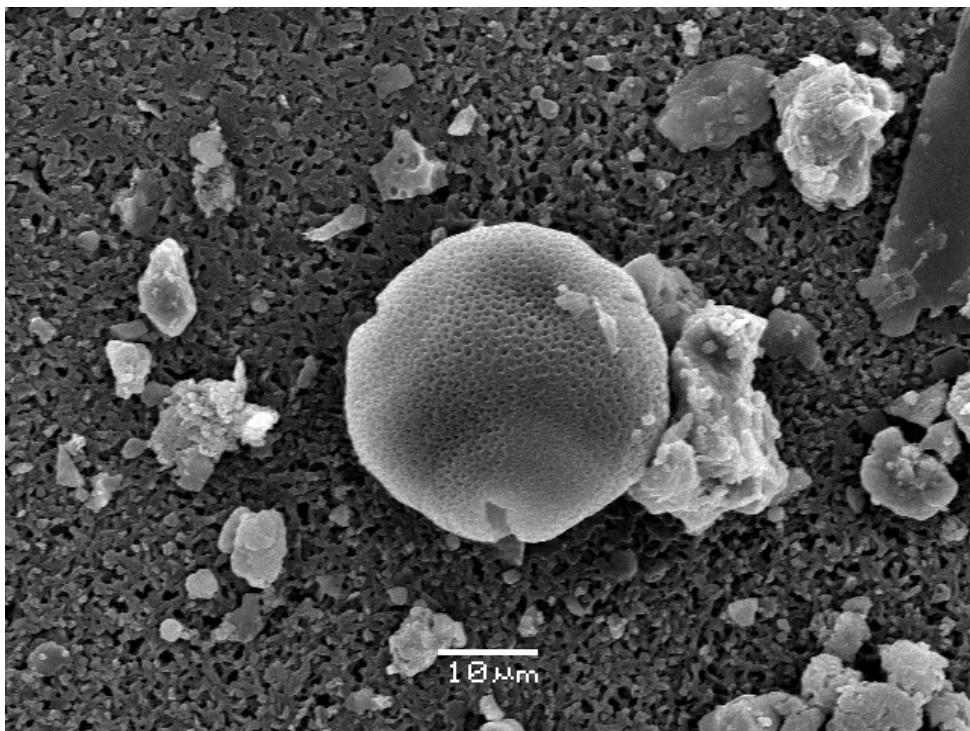
Opět se objevila pylová zrna lipnicovitých (*Poaceae*) a břízovitých (*Betulaceae*), která často byla deformovaná nebo degradovaná. Dalším nálezem byla pylová zrna ambrozie (Obr. 24), která začíná kvést v srpnu.

Na této lokalitě jsme pozorovali brochosomy. Jsou to sekreční produkty hmyzu a pravděpodobně slouží k odpuzování vody (Rakitov R. A., 2002). Četnost výskytu brochosomů je značně větší při vzorkování jednopatrovým impaktorem, než kaskádním. Samotný nález těchto objektů je velice vzácný. Brochosomy se téměř

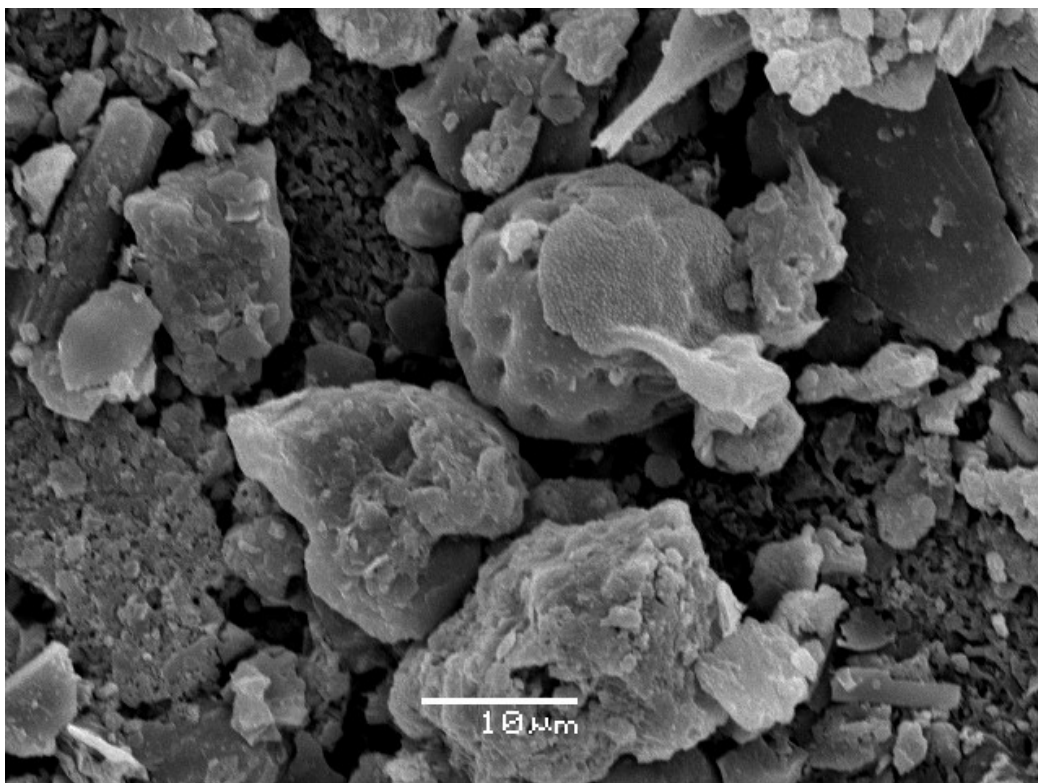
vždy vyskytují v klastrech o počtu asi 2000 najednou a potřebují jakýsi přilnavý substrát. Jejich detekci usnadňuje malé pokrytí filtru aerosolem jiných typů, protože nedochází k zakrytí brochosomů jinými většími částicemi (Wittmaack et al., 2002). Právě v této oblasti jsme nenašli hodně bioaerosolu, ani polétavého prachu.



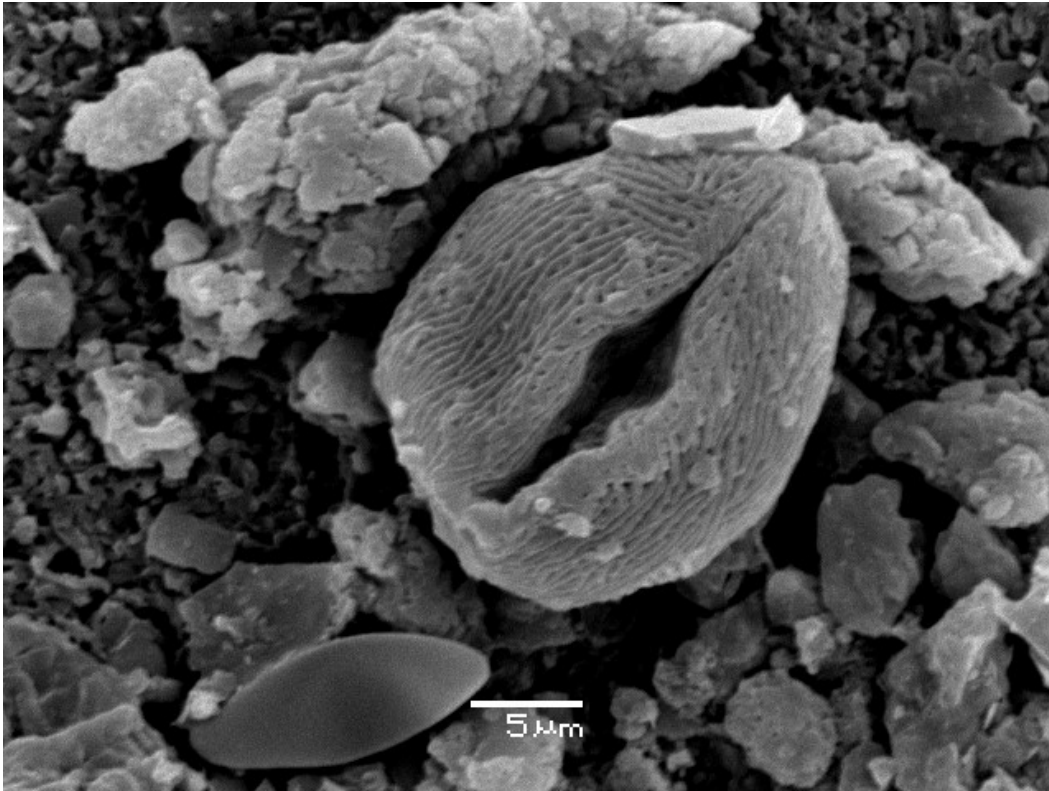
Obr. 12 Olše



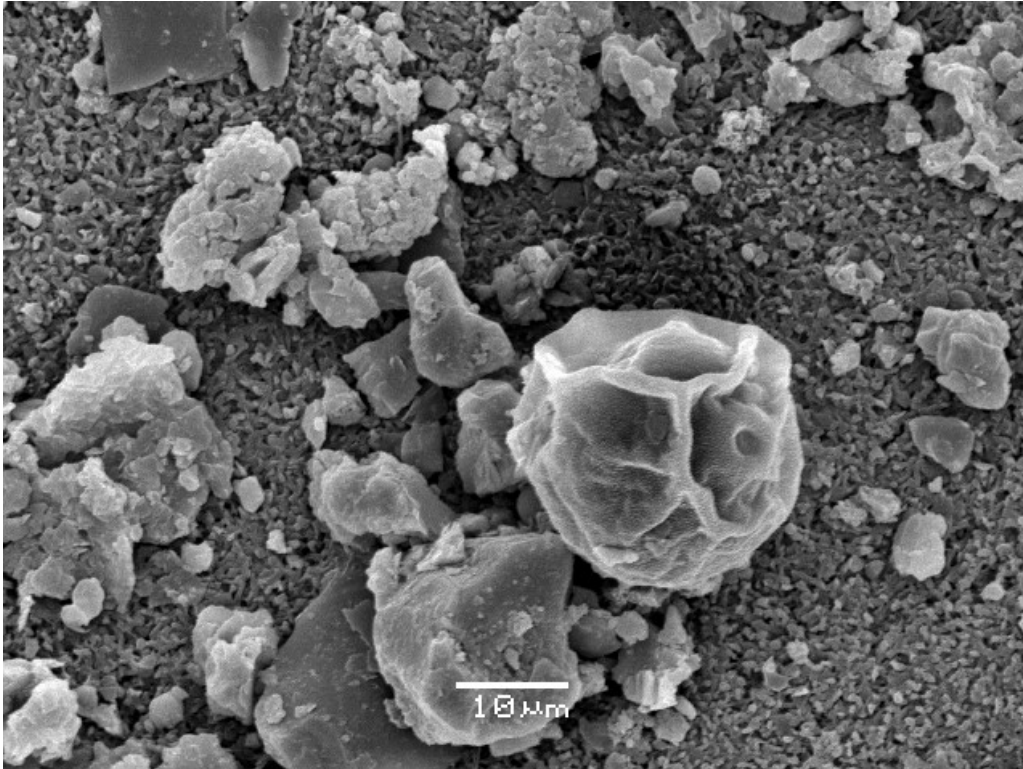
*Obr. 13 Lipa*



*Obr. 14 Laskavec*

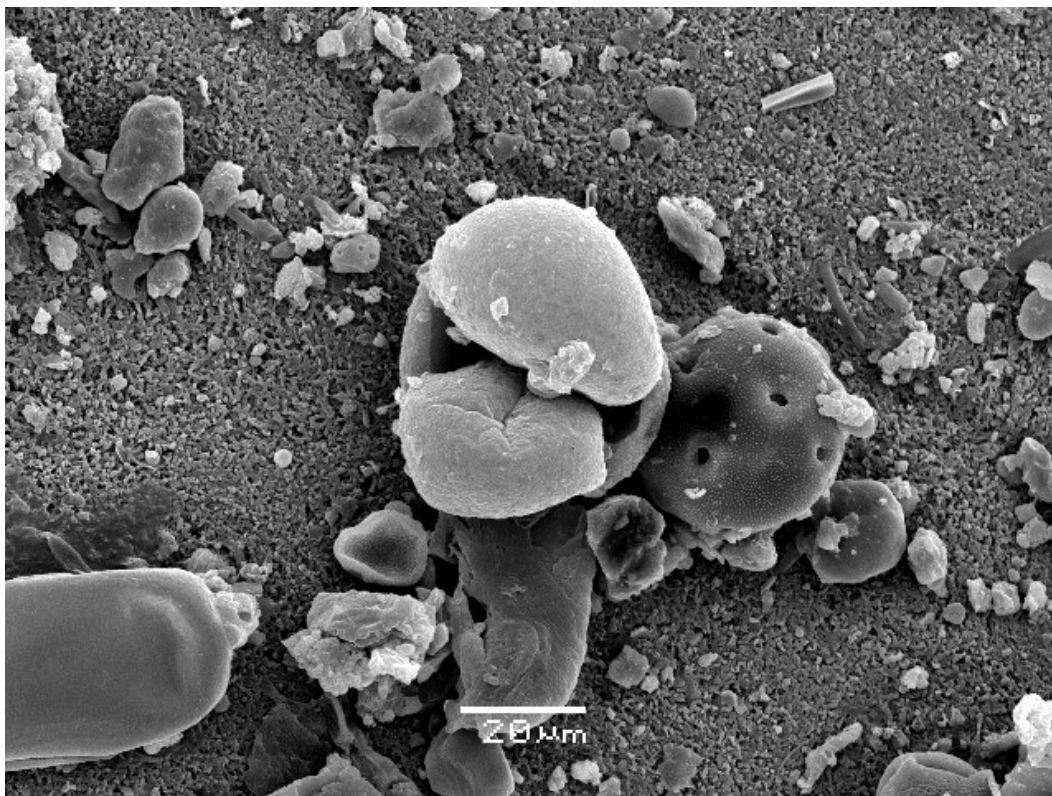


*Obr. 15 Rosaceae*

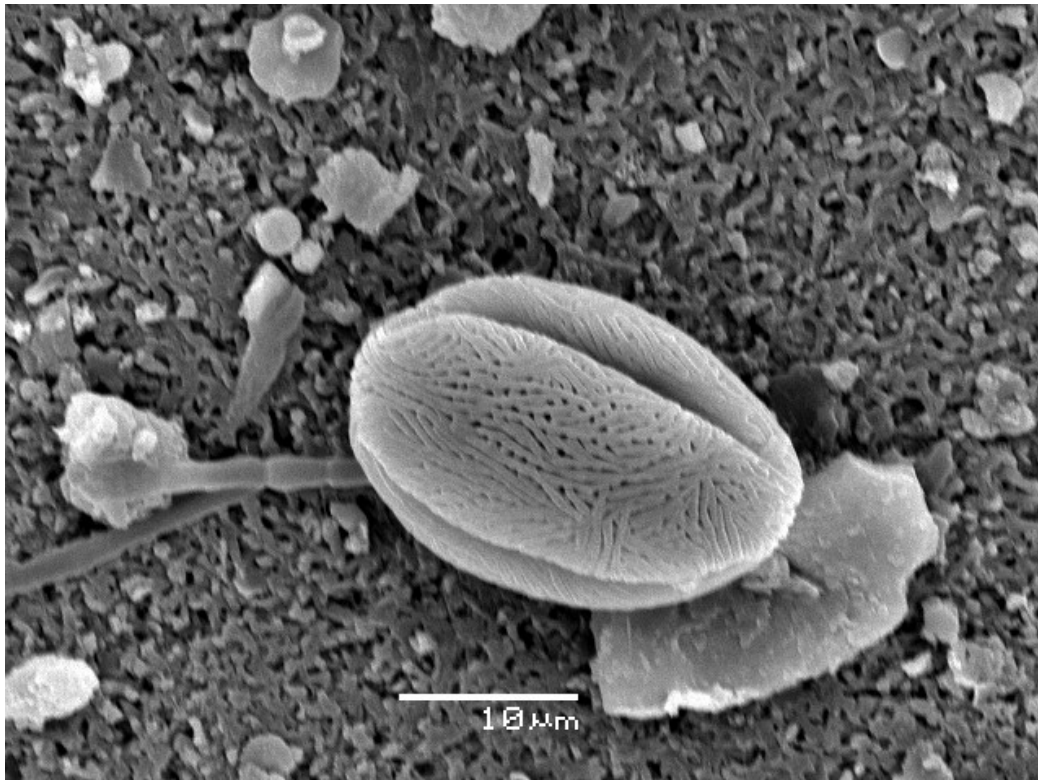


*Obr. 16 Poaceae*

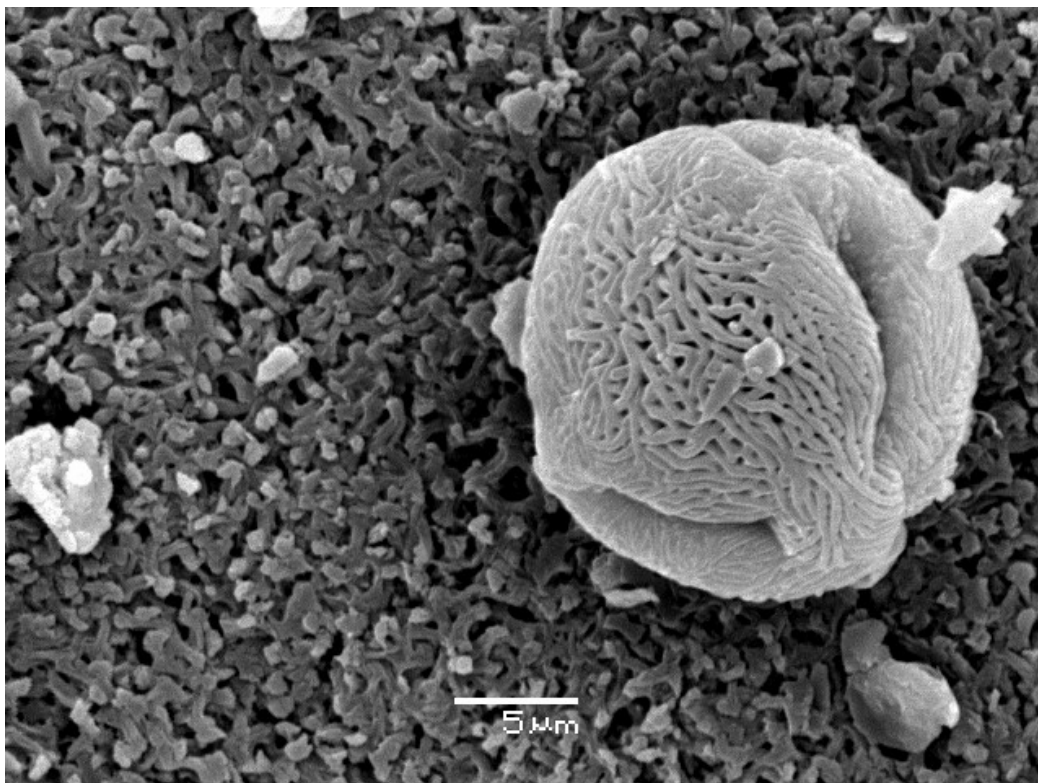




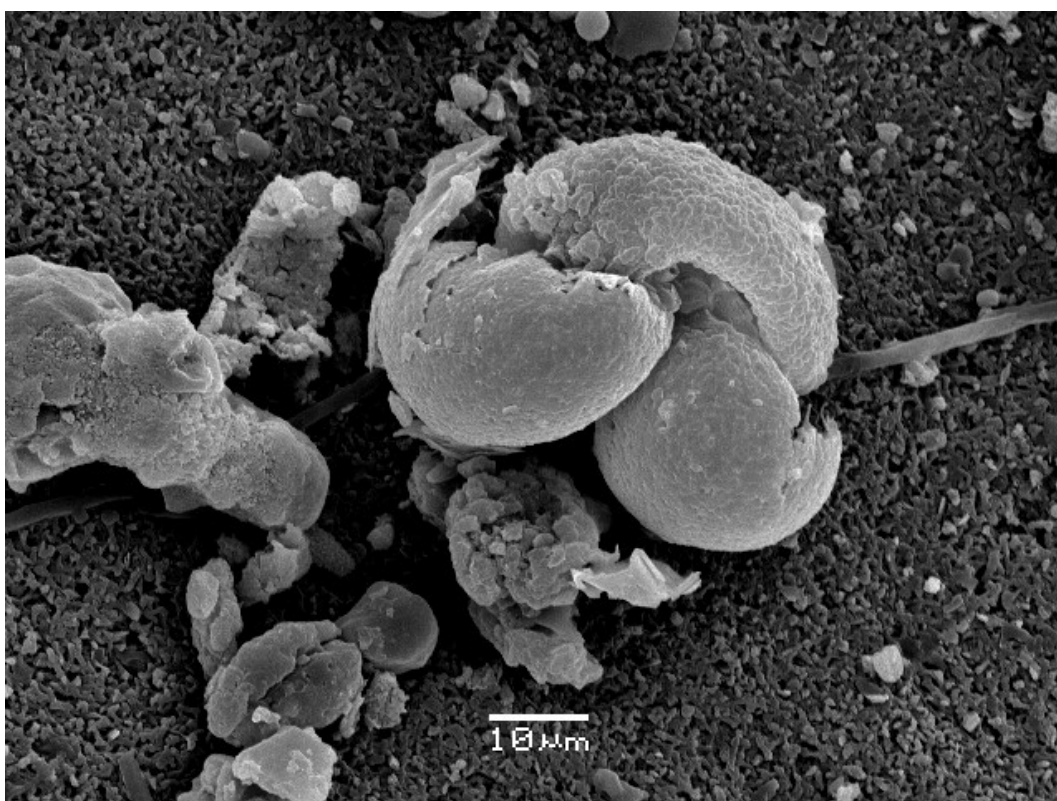
Obr. 17 Borovica a Caryophyllaceae



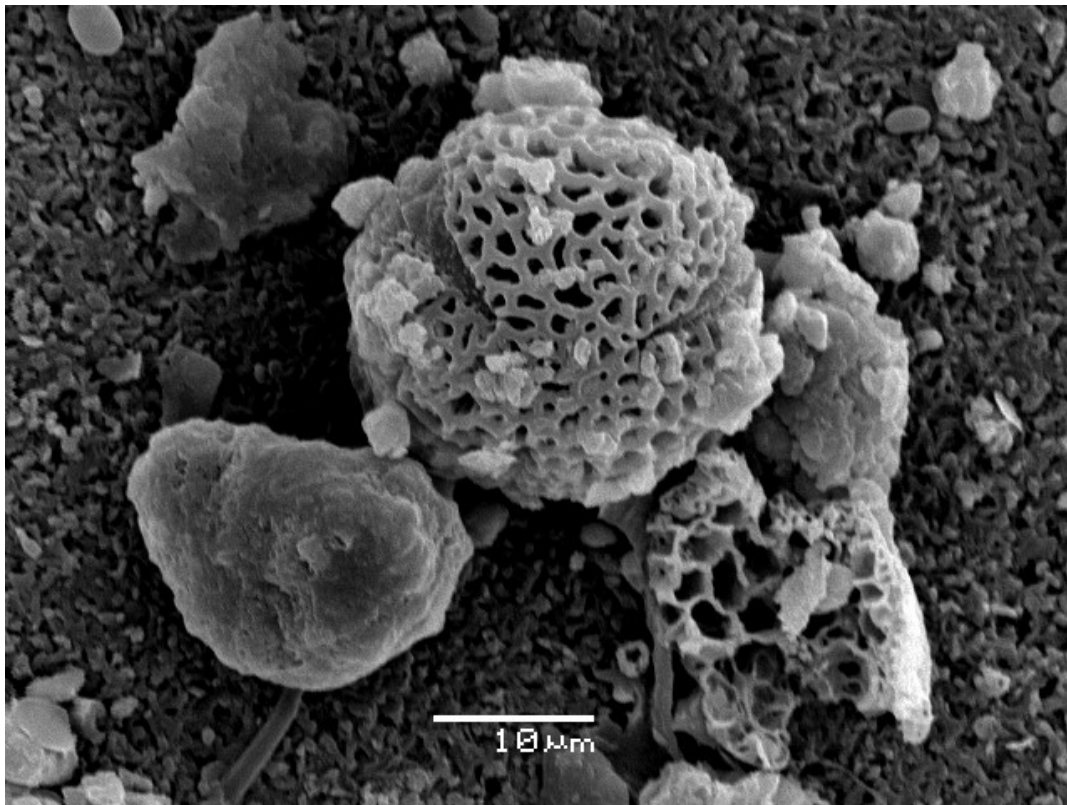
Obr. 18 Javor



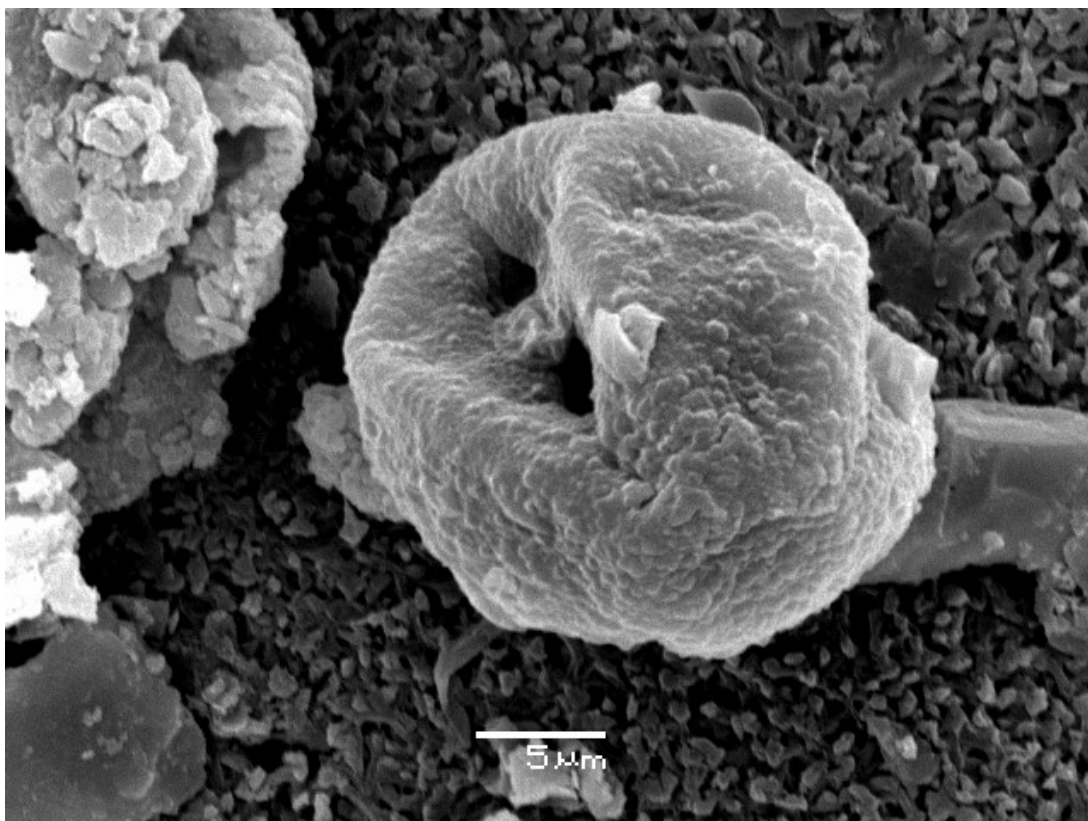
*Obr. 19 Rosaceae*



*Obr. 20 Borovica*

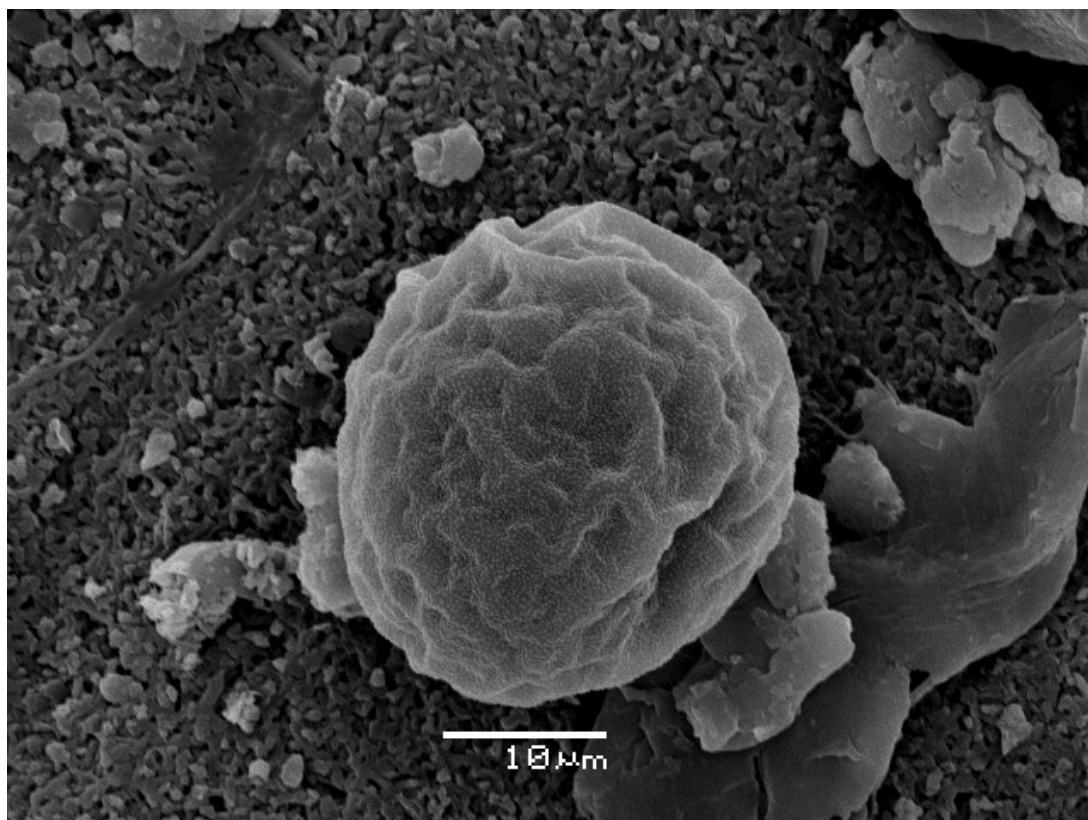


Obr. 21 *Brassicaceae*

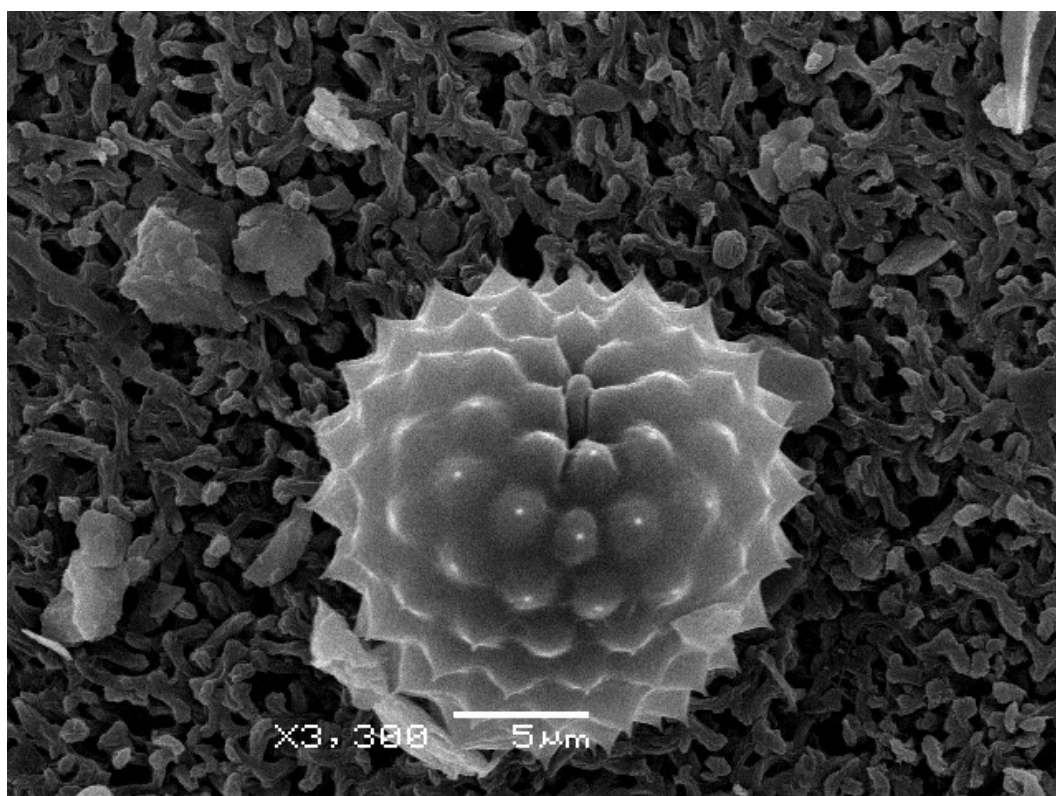


Obr. 22 *Dub*





Obr. 23 Jilm



Obr. 24 Ambrozie

## 6.2. Nalezené deformity

Pro posouzení množství deformit se z každé lokality vybralo prvních 16 udělaných fotografií pylových zrn, které náhodně zahrnují jak pylová zrna celá, tak i deformovaná. Bylo spočítáno celkové množství pylových zrn na těchto fotografiích, a množství nějakým způsobem deformovaných pylových zrn. Procento deformit se vypočítalo jako poměr pylových zrn deformovaných ku celým (Tab. 3).

Tabulka 3 Procento deformací

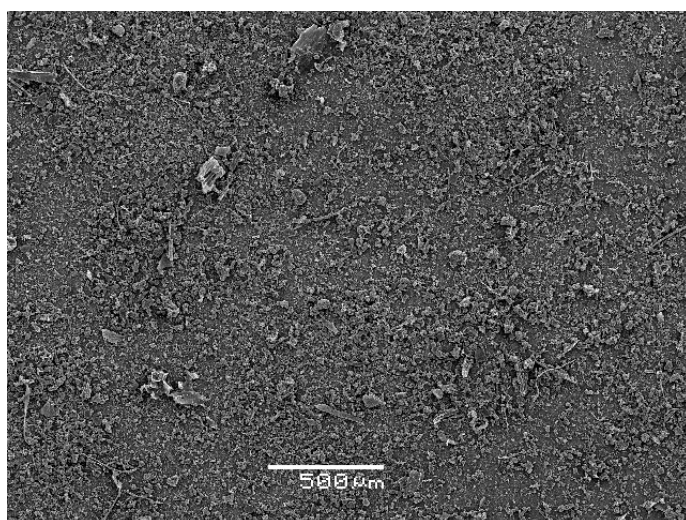
lokalita	počet pylových zrn	Počet deformovaných pylových zrn	Procento deformací
Praha	21	5	24%
Březno	17	3	18%
Láz	12	6	50%

Největší podíl deformovaných pylových zrn se vyskytl na lokalitě Láz. Tento jev souvisí s procesy stárnutí a degradace pylů vzhledem k pozdějšímu období odběru vzorků.

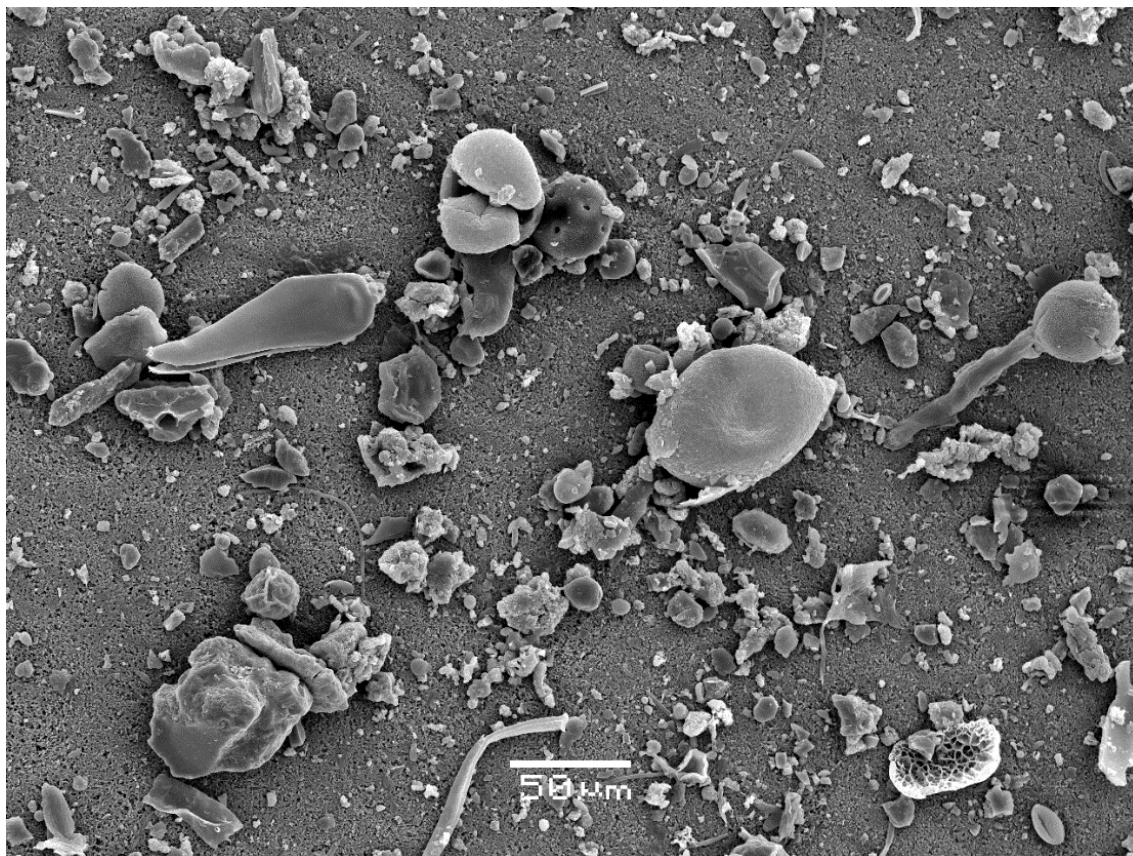
Nelze jednoznačně říci, zda nedochází k poškození struktury pylových zrn při manipulaci neboli deformace je často výsledkem dehydratace (Iwanami Y et al., 1988). Nicméně, deformity určitě nejsou dané procesem odběru vzorků (Wittmaack et al., 2002).

## 6.3. Homogenita vzorků

Při zvětšení 500  $\mu\text{m}$  částice bioaerosolu nejsou rozlišitelné. Jak větší kusy vegetace, tak i hrubý neorganický aerosol se vyskytoval se stejnou frekvencí. Filtrační zařízení Heto SUE 300Q poskytuje homogenní rozložení aerosolu na filtru.



Obr. 25 SEM Snímek filtru s aerosolem při zvětšení x400



Obr. 26 SEM snímek filtru s aerosolem při zvětšení x4000

#### 6.4. Variabilita

Variabilita pylových zrn se zjišťovala tak, že z prvních 17 pylových zrn se vyhledávaly odlišné typy pylových zrn. Ukázalo se, že variabilita pylů byla největší v Praze. Bylo nalezeno až 11 odlišných typů. Ve vzorcích lokality Březno se našlo 7 odlišných typu a na u vodní nádrže Láz jen 5 lišících se pylových zrn ze 17.

#### 6.5. Korelace počtu částic bioaerosolu s hmotností aerosolu

Čím větší byla navážka vzorku, tím častěji jsme částice bioaerosolu  $>10 \mu\text{m}$  pozorovali u vzorků z Prahy. Částice o aerodynamickém průměru  $<10 \mu\text{m}$  jsme pozorovali konstantně v malém množství. Naopak velikou část bioaerosolu z Prahy tvořila pylová zrna. Pro vzorky z lokality Březno a Láz žádná korelace nebyla nalezena.

Průměr filtrační plochy po odečtení 5 mm, které zaujímá filtrační zařízení k fixaci, činí 37 mm. Plocha filtru  $P = \pi * d^2 * 0,25$ ;

$$P = 3,14 * 3700 * 3700 * 0,25 = 1074665000 \mu\text{m}.$$

$1074665000 \cdot \text{plocha snímku}^{-1} \cdot \text{počet pylových zrn} = \text{celkový počet pylových zrn}$ .

Takovým způsobem dostáváme předpokládaný počet pylových zrn na ploše celého filtru. Samozřejmě, že nejde o přesnou kvantifikaci, ale pouze o přibližný odhad počtu pylů. Přibližné koncentrace pylových zrn v ovzduší, které byly vypočítány z celkového objemu vzduchu prosátého impaktorem, odpovídá očekávaným hodnotám. V Praze malý počet pylů na metr krychlový je dán výškou umístění impaktoru nad terénem. Lze si všimnout, že postupem času pylových zrn ubývá.

*Tabulka 4 Počet a koncentrace pylových zrn v jednotlivých vzorcích*

číslo vzorku	Počet pylových zrn na snímku	Plocha snímku ( $\mu\text{m}^2$ )	Navážka aeroslou (mg)	Přibližný počet pylových zrn v celém vzorku	Přibližná koncentrace pylových zrn v ovzduší ( $\text{počet} \cdot \text{m}^{-3}$ )
29A	8	237656	11,3	36175	14,53
31A	6	237656	10,7	27132	10,52
32A	5	237656	7,4	22610	8,92
33A	8	1690000	12,6	5087	1,95
38A	11	1690000	32,8	6995	2,84
39A	4	608400	37,1	7066	2,82
40A	3	237656	16,1	13566	5,38
42A	3	422500	31	7631	2,98
45A	4	237656	0.001	18088	7,13
46A	2	105625	0.001	20349	7,98
47A	2	105625	0.001	20349	8,03
48A	2	237656	9,7	9044	3,49

## 7. Závěr

Prokázali jsme, že 1. frakci vysokoobjemového kaskádního impaktoru HiVol BGI-900 lze využít k odběru a analýze bioaerosolu. Velký průtok impaktorem umožňuje odebrat reprezentativní objem vzorku vzduchu za nízké rychlosti průtoku vzduchu a malé tlakové ztrátě na trysce, kdy lze předpokládat nízké poškození biologického materiálu při vzorkování.

Z impakčního substrátu, polyuretanové pěny, je možné s využitím optimalizované metody extrahovat atmosférický aerosol, připravit homogenní vzorek pro tvarovou analýzu bioaerosolu SEM.

Při SEM analýze se ukázalo, že vzorky obsahují značné množství bioaerosolů. Mezi ně patřily houby, jejich spory, brochosomy hmyzu a pyly. Některé rody pylových zrn se podařilo identifikovat. Nejběžnější čeledí pylu, která se nacházela ve všech vzorcích bez výjimky byla čeleď lipnicovité (*Poaceae*). Rozdíly v kvalitativním složení pylů byly výrazné. Početnost pylových zrn souvisí se sezónami kvetení rostlin.

## 8. Seznam použité literatury

Agarwal R., Shukla S.K, Dharmani S., Gandhi A.: Biological Warfare—An Emerging Threat, JAPI. 2004, Vol. 52, No. 9, p.733-738

Baloun, J. Rostliny způsobující otravy a alergie. Avicem, zdravotnické nakladatelství, Praha. 1989, p.235

Baron P.A., Willeke K. Aerosol measurement: principles, techniques, and applications. 2001, p.33-34

Bassett J., Crompton C.W., Parmelee J. A. An Atlas of Airborne Pollen Grains and Common Fungus spores of Canada. 1978

Bones D. L., Henriksen, D. K., Mang, S. A., Gonsior, M., Bateman, A. P., Nguyen, T. B., Cooper, W. J., and Nizkorodov, S. A.: Appearance of strong absorbers and fluorophores in limonene- O-3 secondary organic aerosol due to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-mediated chemical aging over long time scales, J. Geophys. Res.-Atmos., 115. 2010, p.38-39

Braniš M., Hůnová I. Atmosféra a klima – aktuální otázky ochrany ovzduší. Karolinum, Praha. 2009, p.351

Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., and Pöschl, U.: Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems, Atmos. Chem. Phys., 9. 2009, p.9263–9280

Charpin J., Surinych R., Frankland A.W. 1974: Atlas Européen des pollens allergisants – Atlas of European allergenic pollens. Sandoz Édition, Paris.

Cross T.A., Thompson G.G., Zaitzeff J.B. Source and distribution of palynomorphs in bottom sediments, southern part of the Gulf of California. Mar. Geol. 4 (6). 1966, p.467-524

Davies R.R., Denny M.J. & Newton L.M. A comparison between the summer and autumn air spores at London and Liverpool. Acta Allergologica, 18. 1963, p.131-147

- Demokritou P., Kavouras I. G., Ferguson S. T., Koutrakis P. Development of a High Volume Cascade Impactor for Toxicological and Chemical Characterization Studies. *Aerosol Science and Technology* 36. 2002, p.925–933
- Després, V. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. 2011, p.2
- Diehl K., Quick C., Matthias-Maser S., Mitra S. K., Jaenicke R.: The ice nucleating ability of pollen. Part I: Laboratory studies in deposition and condensation freezing modes, *Atmos. Res.* 2001, 58, p.75–87
- Digiovanni, F., Kevan, P. G. and Nasr, M. E. The variability in settling velocities of some pollen and spores. *Grana* 34. 1995, p.39-44
- Durham O.C. A proposed Standard Method of Gravity Sampling, Counting, and Volumetric Interpolation of results. *Journal of Allergy*, 17 (2). 1947, p.79–86
- Elbert W., Taylor P.E., Andreae M.O., Pöschl U. Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7. 2007, p.4569-4588
- Ellstrand N. C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos*. 1992, p.77-86
- Erdtman G. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Anigospems. In *Introduction In Palynology*. 1952
- Erdtman, G. An Introduction to Pollen Analysis. *Chronica Botanica Company*. Waltham. MA. USA. 1954
- Erdtman, G. *Handbook of Palynology: Morphology, Taxonomy, Ecology*. Munksgaard, Copenhagen. 1969
- Fægri, K. and Iversen, J. *Textbook of pollen analysis*. John Wiley & Sons, New York. 1989
- Fall, P.L. Pollen taphonomy in a canyon stream. *Quat. Res.* 28. 1987, p.393-406
- Frei T. Pollen distribution at high elevation in Switzerland: evidence for medium range transport. *Grana* 36. 1997, p.34
- Fröhlich-Nowoisky, J., Burrows, S.M., Xie, Z., Engling, G., Solomon, P.A., Fraser, M.P., Mayol-Bracero, O.L., Artaxo, P., Begerow, D., Conrad, R., Andreae, M.O., Després, V.R., Pöschl, U. Biogeography in the air: fungal diversity over land and oceans. *Biogeosciences* 9. 2012, p.1125–1136
- Gamlin L. *Alergie od A do Z*. Praha: Readers Digest. 2003, p.256
- Golovko V.V., Kirov E.I., Koutzenogii K.P. Seasonal and Daily Cycles of a Pollen Cloud On the South Of Western Siberia. *J. Aerosol Sci.* 1999, Vol 30. p.733-734

Greenburg, L., Bloomfield, J.J. The impinger dust sampling apparatus as used by the United States Public Health Service. Public Health Reports 47. 1932, p.654–675

Gregory P. H. Microbiology of the atmosphere. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons. 1973

Henningson, E.H., Fangmark, I., Larsson, E., Wikstrom, L. Collection efficiency of liquid samplers for microbial aerosols. Journal of Aerosol Science 19. 1988, p.911–914

Heslop-Harrison J. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses. Science. 215, 13. 1982, p.58-64

Heslop-Harrison Y. Control gates and microecology: the pollen-stigma interaction in perspective. Ann Botany. 85 (Suppl A). 2000, p.5-13

Hinds W.C. Aerosol technology. New York, NY: John Wiley & Sons, Ltd. 1982, p. 78, p.104-126, p.165

Hinds W.C. Aerosol technology. 2nd ed. New York: Wiley Interscience; 1998, p.226-227

Huffman, J. A., Sinha, B., Garland, R. M., Snee-Pollmann, A., Gunthe, S. S., Artaxo, P., Martin, S. T., Andreae, M. O., and Pöschl, U.: Size distributions and temporal variations of biological aerosol particles in the Amazon rainforest characterized by microscopy and real-time UV-APS fluorescence techniques during AMAZE-08, Atmos. Chem. Phys., 12. 2012, p.119-120

Ingold C. T. Mechanisms of liberation of spores and pollen. In Allergen durch und Sporen. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg, Kennedyallee 40. 1971, p.120-125

Iwanami Y., Sasakuma T., Yamada Y. Pollen: Illustrations and Scanning Electromicrographs. 1988, p.8-17

Jimenez J. L. et al., Science. 326. 2009, p.1525

Jonas F. Atlas zur Bestimmung rezenter und fossiler Pollen und Sporen. 1952

Jones A., Harrison, R. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations a review. Science of the Total Environment 326. 2004, p.151-180

Karlsson, K., Malmberg, P. Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and the culture method. Scand. J. Work Environ. Health, 15. 1989, p.353–359

Klietmann W.F., Ruoff K.L.: Bioterrorism: Implication for the Clinical Microbiologist, Clinical Microbiology review. Vol. 14, No. 2. 2001, p.364-381



Kuparinen, A., Katul, G., Nathan, R. and Schurr, F. M. Increases in air temperature can promote wind-driven dispersal and spread of plants. *Proceed. R. Soc. Lond.* 276. 2009, p.3081-3087

Leslie G.B.: Review, Health Risks from Indoor Air Pollutants: Public Alarm and Toxicological Reality. *Indoor and Built Environment.* , Vol. 9, Issue. 1. 2000, p.5-16

Li J., Xu Q.H., Zhang S.R., Mu H.S., Li Y., Li M.Y., Hu Y.N., Liang J. Relative pollen productivity and its use in quantitative reconstruction of paleovegetation. *Res.* 33(6), 2013, p.1101-1110

Li Y.C., Xu Q.H., Ge Y.W., Li Y., Lu S.Q., Cao X.Y., Tian F., Hao L.S. Airborne pollen assemblages and maximum source area in dust and non-dust weather in the central and eastern Loess Plateau. *Geogr. Res.* 33. 2014, p.2367-2381

Lim D.V., Simpson J. M., Kearns E.M, Kramer M.F: Current and developing technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and biowarfare, *Clinical Microbiology reviews.* Vol. 18, No 4. 2005, p.583-607

Linskens H. F., Jorge, W. Pollenstransport in gro ßen Ho hen. Beobachtungen wa hrend der Fahrt mit einem Gasballon. *Allergologie* 9. 1986, p.55-58

Lo E., Levetin, E. Influence of meteorological conditions on early spring pollen in the Tulsa atmosphere from 1987-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119. 2007, p.27-29

Mayera C., Van Rossum F., Jacquemart A. L. Evaluating pollen flow indicators for an insect-pollinated plant species. *Basic and Applied Ecology* 13. 2012, p.690–697

Matthias-Maser S. and Jaenicke, R. Size distribution of primary biological aerosol particles with radii >0.2 (µm) in an urban/rural influenced region. *Atmos. Res.* 39. 1995, p.279–286

Meyer-Melikan N., SEVEROVA E., POLEVOVA S. POLLEN GRAINS AS A CAUSE OF POLLINOSIS. 1993, Vol.27. p.251-252

Mimura A. M. S., Ferreira C. C. M., Silva J. C. J. Fast and feasible sample preparation methods for extraction of trace elements from deposited particulate matter samples. *Anal. Methods* 9. 2017, p.490-499

Mohler O., DeMott P. J., Vali G., Levin, Z.: Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics, *Biogeosciences* 4. 2007, p.1059-1071

Monin A. S., Obukhov A. M. Basic laws of turbulent mixing in the ground layer of the atmosphere. *Trudy Geofizicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR.* 151. 1954, p.163-187

Mullins J., Emberlin J. Sampling pollens. *J. Aerosol Sci.* Vol. 28, No 3. 1997, p.365-370

- Novák J., Nováková H. Alergenní rostliny. 2010, p.364
- Ogden, E. C., Hayes, J. V. and Raynor, G. S. Diurnal patterns of pollen emission in *Ambrosia*, *Phleum*, *Zea*, and *Ricinus*. *Am. J. Bot.* 56. 1969, p.16-21
- Pasken R., Pietrowicz J. Using dispersion and mesoscale meteorological models to forecast pollen concentrations. *Atmospheric Environment* 39. 2005, p.7689-7701
- Pennington W. The origin of pollen in lake sediments: an enclosed lake compared with one receiving inflow streams. *New Phytol.* 83. 1979, p.189-213
- Pöhlker C. et al., *Science*. 337. 2012, p.1075
- Pöschl U. et al., *Science*. 329. 2010, p.1513
- Primmerman Ch. A.: Detection of Biological Agents, *Lincoln Laboratory Journal*. Vol. 12, No. 1. 2000, p.3-32
- Pruppacher, H. R. & Klett, J. D. *Microphysics of Clouds and Precipitation*. 1997, p.259-280
- Pummer B. G., Bauer H., Bernard, J., Bleicher S., Grothe, H. Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen. *Atmos. Chem. Phys.* 12. 2012, p.2541–2550
- Rakitov R.A. What are brochosomes for? An enigma of leafhoppers (Hemiptera, Cicadellae). *Denisia* 04. 411. 2002, p.32
- Ranta H., Kubin E., Siljamo, P., Sofiev M. Long distance pollen transport cause problems for determining the timing of birch pollen season in Fennoscandia by using phenological observations. *Grana* 45. 2006, p.297-304
- Rantio-Lehtimäki A., Kauppinen E., Koivikko A. Efficiency of a new bioaerosol sampler in sampling *Betula* pollen for antigen analysis. *Adv Aerobiol Exp.* 51. 1987, p.383-390
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. *Biology of plants*. 6th ed. New York: WH Freeman. 1999, p.360-362
- Reiger M. *Alergie, Aeroplankton, Zeleň*. Praha: Český ekologický ústav. 1996, p.7, p.69
- Reiger M. *Pylové Alergie a životní prostředí*. Praha: Český ekologický ústav. 1995, p.7-8
- Rempe, H.. *Untersuchungen u ber die Verbreitung des Blutenstaubes durch die Luftströmungen*. *Planta* 27. 1937, p.93-147
- Shan J., Wilkins E.: Electrochemical biosensors for Detection of Biological Warfare Agents, *Electroanalysis*. Vol. 15, No. 3. 2003, p.157-167
- Sofiev M., Siljamo P., Ranta H., Rantio-Lehtimäki A. Towards numerical forecasting of long range air transport of birch pollen: theoretical considerations

and a feasibility study. *International Journal of Biometeorology* 50. 2006, p.392-402

Sowig P. Effects of flowering plant's patch size on species composition of pollinator communities, foraging strategies, and resource partitioning in bumblebees (Hymenoptera: Apidae). *Oecologia*, 78. 1989, p.550-558

Spurny K. R. On the chemical detection of bioaerosols. *J. Aerosol Sci.* 25. 1994, p.1533–1547

Spieksma F. T. M., Nolard N., Frenguelli G., Van Moerbeke D.: *Pylový atlas Evropy*. 1996

Stanley R., Linskins H. *Pollen: Biology, Chemistry and Management*. Springer-Verlag, Berlin. 1974, p.24-36

Stickley A., Fook C. Airborne pollen and suicide mortality in Tokyo. *Environmental Research*. 155. 2017, p.134-140

Straka H. *Pollen- und Sporenkunde*. Fischer Verlag, Stuttgart. 1975, p.20-23

Sykes D. The development of a bioaerosol sampler for the detection of enzymes in industry. University of Teesside, UK; 2005

Tauber, H. Investigations of the mode of pollen transfer in forested areas. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 3. 1967, p.277-286

Taylor P. E., Flagan R., Miguel A. G., Valenta R., Glovsky M. M. Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clin. Exp. Allergy*. 2004, 34, p.1591-1596

Teřl M. & Rybníček O. *Asthma bronchiale v příčinách a klimatických obrazech*. Geum, Praha. 2006, p.311

Thomson J. D., Plowright R. C. Pollen carryover, nectar rewards, and pollinator behavior with special reference to *Diervilla lonicera*. *Oecologia*, 46. 1980, p.68–74

Wakefield A. E. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii*, sp. S. and *Pneumocystis carinii* sp. s. hominis in samples of the air spora. *J. Clin. Microbiol.* 34. 1996, p.1754-1759

Wang Z.H., X, Q.H. Air pollen assemblage characteristics derived from duststorms and non-duststorms and its significance. *Geogr. Res.* 25. 2006, p.262-267

Waser N. M. Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: A review of evidence. In C. E. Jones, R. J. Little (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology*. 1983, p.277–293

Wittmaak K., Wehnes. H., Heinzmann U., Agerer R.H. An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Science of the Total Environment* 346. 2005, p.244-255

Wu Y., Shen F., Yao M. Use of gelatin filter and BioSampler in detecting airborne H5N1 nucleotides, bacteria and allergens. J Aerosol Sci. 41. 2010, p.869-879

Zare R.N. My life with LIF: a personal account of developing laser-induced fluorescence. Annu. Rev. Anal. Chem. 5. 2012, p.1-14

Internetové zdroje:

[www.pyly.cz](http://www.pyly.cz)

[www.google.cz/maps](http://www.google.cz/maps)

[www.pylovasluzba.cz](http://www.pylovasluzba.cz)

[www.czso.cz](http://www.czso.cz)

[www.brdy.ochranaprirody.cz](http://www.brdy.ochranaprirody.cz)